

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

BIOPROSPECÇÃO DE MICROALGAS DULCÍCOLAS COM POTENCIAIS
BIOTECNOLÓGICOS: INFLUÊNCIA
DA TEMPERATURA NO CULTIVO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA

ALINE LOURENÇO VIEIRA DA SILVA

Orientador: Prof^o. Dr. Roberto Sassi
Co-orientadora: Prof^a. Dra. Cristiane Francisca da Costa Sassi

JOÃO PESSOA – 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

BIOPROSPECÇÃO DE MICROALGAS DULCÍCOLAS COM POTENCIAIS
BIOTECNOLÓGICOS: INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NO CULTIVO E
COMPOSIÇÃO QUÍMICA

ALINE LOURENÇO VIEIRA DA SILVA

Orientador: Prof^o. Dr. Roberto Sassi.

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Cristiane Francisca da Costa Sassi

Monografia apresentada ao Curso de
Ciências Biológicas (Trabalho Acadêmico
de conclusão de Curso), como requisito
parcial à obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S586b Silva, Aline Lourenco Vieira da.

BIOPROSPECÇÃO DE MICROALGAS DULCÍCOLAS COM POTENCIAIS
BIOTECNOLÓGICOS: INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NO CULTIVO E
COMPOSIÇÃO QUÍMICA / Aline Lourenco Vieira da Silva. -
João Pessoa, 2014.

68 f. : il.

Orientação: Roberto Sassi.

Coorientação: Cristiane Francisca da Costa Sassi.

TCC (Especialização) - UFPB/CCEN.

1. Scenedesmus acuminatus. 2. Planktothrix sp. 3. FTIR.
I. Sassi, Roberto. II. Sassi, Cristiane Francisca da
Costa. III. Título.

UFPB/BC

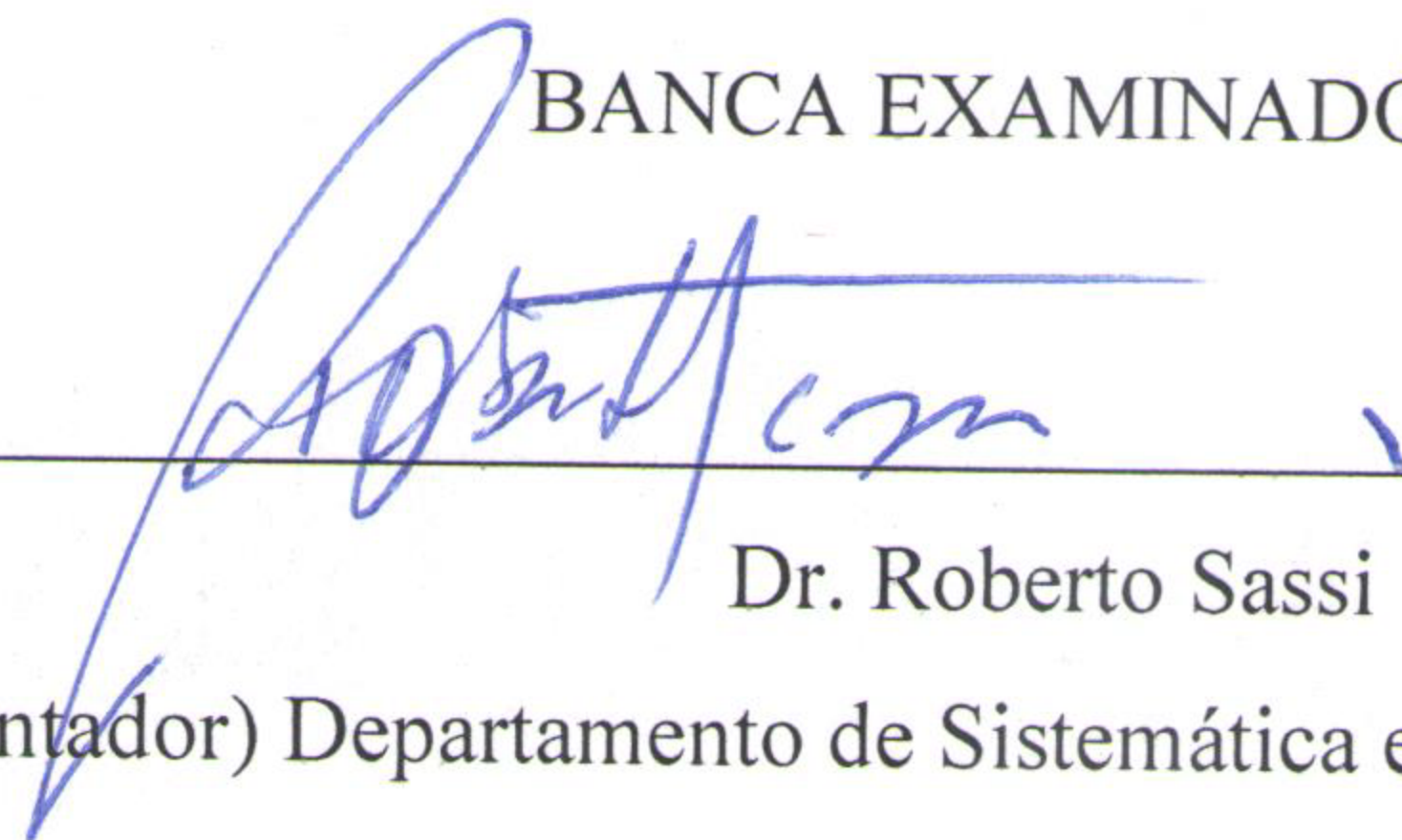
UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ALINE LOURENÇO VIEIRA DA SILVA

BIOPROSPECÇÃO DE MICROALGAS DULCÍCOLAS COM POTENCIAIS
BIOTECNOLÓGICOS: INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NO CULTIVO E
COMPOSIÇÃO QUÍMICA

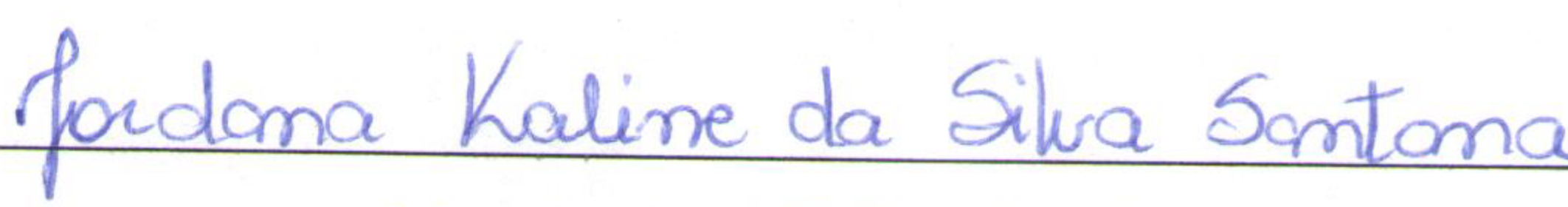
Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas, como requisito parcial à
obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas

BANCA EXAMINADORA:




Dr. Roberto Sassi
(Orientador) Departamento de Sistemática e Ecologia/CCEN/UFPB

Dr^a.Ilda Antonieta Salata Toscano
Departamento de Química/CCEN/UFPB



Msc. Jordana Kaline da Silva Santana
Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos/UFPB



Msc. Katharina Kardinele Barros Sassi
Programa de Pós Graduação em Ciências e Tecnologia de Alimentos/CT/UFPB

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

BIOPROSPECÇÃO DE MICROALGAS DULCÍCOLAS COM POTENCIAIS
BIOTECNOLÓGICOS: INFLUÊNCIA
DA TEMPERATURA NO CULTIVO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA

ALINE LOURENÇO VIEIRA DA SILVA

Orientador: Prof^o. Dr. Roberto Sassi
Co-orientadora: Prof^a. Dra. Cristiane Francisca da Costa Sassi

JOÃO PESSOA – 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

BIOPROSPECÇÃO DE MICROALGAS DULCÍCOLAS COM POTENCIAIS
BIOTECNOLÓGICOS: INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NO CULTIVO E
COMPOSIÇÃO QUÍMICA

ALINE LOURENÇO VIEIRA DA SILVA

Orientador: Prof^o. Dr. Roberto Sassi.

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Cristiane Francisca da Costa Sassi

Monografia apresentada ao Curso de
Ciências Biológicas (Trabalho Acadêmico
de conclusão de Curso), como requisito
parcial à obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ALINE LOURENÇO VIEIRA DA SILVA

BIOPROSPECÇÃO DE MICROALGAS DULCÍCOLAS COM POTENCIAIS
BIOTECNOLÓGICOS: INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NO CULTIVO E
COMPOSIÇÃO QUÍMICA

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas, como requisito parcial à
obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas

BANCA EXAMINADORA:

Dr. Roberto Sassi

(Orientador) Departamento de Sistemática e Ecologia/CCEN/UFPB

Dr^a. Ilda Antonieta Salata Toscano

Departamento de Química/CCEN/UFPB

Msc. Jordana Kaline da Silva Santana

Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos/UFPB

Msc. Katharina Kardinele Barros Sassi

Programa de Pós Graduação em Ciências e Tecnologia de Alimentos/CT/UFPB

AGRADECIMENTOS

Agradeço a tudo que guia minha vida e ilumina os meus caminhos, que apesar de nem sempre mostrar os percursos mais fáceis, com certeza me direciona para os que geram mais aprendizados.

Agradeço a minha família, em especial aos meus pais: Heleno Lourenço e Rizonete Vieira, e irmãos: Águeda Lourenço e Helder Lourenço por todos os ensinamentos de vida e de convivência, por acreditarem no meu potencial, sempre me incentivando a continuar.

Agradeço ao Prof. Dr. Roberto Sassi por ser acima de tudo uma pessoa extraordinária e abraçar cada ser que passa na sua vida, crendo que cada um pode crescer e alcançar objetivos cada vez mais altos. Muito obrigada por me ensinar durante todos esses anos e acreditar em mim.

Agradeço a Humberto Júnior por compartilhar sua vida comigo, estar ao meu lado nas horas mais fáceis e mais difíceis, por acreditar que sou capaz e sempre me ajudar a tomar as melhores decisões. Muito obrigada por toda a paciência, dedicação e amor.

Agradeço imensamente a todos os membros do LARBIM que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento pessoal e/ou profissional. Em especial a minhas amigas de todos os dias Patrícia Sassi e Jordana Kaline (Jords), pelos almoços no Bonaparte e RU (porque a vida é dura!), risadas, discussões, mas principalmente por estarem sempre me incentivando e querendo o meu melhor.

Agradeço em especial à Clediana Dantas que sempre tirou um tempo de seus afazeres para explicar e mostrar o mundo da química a mim sem nem pensar duas vezes. Obrigada por toda dedicação e ensinamento.

Agradeço a minha amiga de vida e jornada acadêmica Valberta Cabral (estou te dando um parágrafo todo visse?). Muito obrigada por sempre querer o meu melhor e incentivar os meus estudos, por me deixar entrar na sua vida, por me indicar ao estágio sem nem me conhecer direito na época, pelas saidinhas, pelas vidas no Candy Crush (responda minha solicitação, por favor!) e por todos os momentos que passamos juntas conversando e macerando geoprópolis (Bons tempos!).

Agradeço a todos os professores que passaram pela minha vida acadêmica e deixaram algum ensinamento que levo comigo. Em especial a Eliete Zárata, Amélia

Kanagawa, Rita Baltazar e Creão Duarte, todos vocês mostraram que fazer o que gosta é o melhor a se fazer sempre.

Ao Dr. Roberto Antoniosi Filho do Laboratório de Métodos de Extração e Separação da Universidade Federal de Goiás e sua equipe, pelas análises cromatográficas das amostras de microalgas estudadas.

Ao Prof. Dr. Antônio Gouveia do Laboratório de Combustíveis e Materiais e sua equipe pelas análises de FTIR das microalgas analisadas.

Ao CNPq pela concessão de bolsa ITI-A através do projeto “Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação na Produção de Biodiesel de Óleos Derivados de Microalgas”, financiado pelo MCTI/FINEP.

RESUMO

Foram estudadas espécies de microalgas dulcícolas isoladas de amostras de água de locais distribuídos pela Paraíba, Rio Grande do Norte e Bahia. As amostras coletadas foram inoculadas em meio WC e Zarrouk preparado com água destilada autoclavada e mantidas em câmara de cultivo climatizada no Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia com Microalgas da Universidade Federal da Paraíba (LARBIM/UFPB). As dez microalgas isoladas foram codificadas e incluídas no Banco de Microalgas do LARBIM/UFPB. Todas as cepas foram identificadas ao menor nível taxonômico possível com utilização de microscopia ótica e consulta de acervos. Foram desenvolvidos ensaios laboratoriais em balões de vidro contendo 5L de meio de cultura acrescidos de um volume inicial de $5 \cdot 10^3$ a 10^4 cél.mL⁻¹, a 25°C, fotoperíodo 12 horas claro:escuro e aeração constante. Os cultivos foram acompanhados por fluorescência *in vivo* e interrompidos no início da fase estacionária para obtenção da biomassa seca e posteriores análises dos teores de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) por cromatografia gasosa. Todas as 10 microalgas estudadas apresentaram teores de ácido palmítico, esteárico, palmitoléico e linolênico. A cepa D39Z se destacou por apresentar valor de 18,1% de ácido γ -linolênico. As cepas D115WC e D132WC apresentaram os maiores teores de ésteres com 415,7 mg.g⁻¹ e 391,1 mg.g⁻¹, respectivamente. As cepas D39Z, D115WC e D132WC foram escolhidas para os cultivos em diferentes temperaturas (20°C, 25°C e 30°C) a partir dos resultados obtidos na primeira etapa do estudo. Todas as cepas apresentaram redução do rendimento final em biomassa seca nos cultivos a 20°C, e diminuiram o tempo de cultivo total para 13 dias e cresceram o rendimento final em biomassa seca nos cultivos a 30°C, com maior valor de 1,020 g.L⁻¹ (D39Z). A D115WC a 30°C apresentou o maior teor de ésteres com 534,44 mg.g⁻¹ e a cepa D39Z apresentou maior teor proteico na temperatura de 20°C, com 62,10%. A cepa D132WC apresentou seus maiores valores de velocidade de crescimento ($1,12 \pm 0,39$), conteúdo proteico (50,87 %), de carboidratos (24,14 %), lipídico (24,78 %) e de ésteres (289,55 mg.g⁻¹) a 20°C, sendo considerada sua temperatura ideal de cultivo. A metodologia de FTIR mostrou-se promissora para detecção de lipídeos e carboidratos em microalgas.

Palavras-chave: *Scenedesmus acuminatus*, *Planktothrix* sp., FTIR.

ABSTRACT

We studied isolated species of freshwater microalgae of local water samples distributed by Paraíba, Rio Grande do Norte and Bahia. The samples were inoculated in WC and Zarrouk prepared with autoclaved distilled water and kept in climate-controlled growth chamber in Laboratório de Ambientes Recifais e de Biotecnologia com Microalga in Universidade Federal da Paraíba (LARBIM/UFPB). The ten isolated microalgae were coded and included in Microalgae Bank LARBIM / UFPB. All strains were identified to the lowest taxonomic level possible using optical microscopy and collections consultation. Laboratory tests were conducted in flasks containing 5L of culture medium increased by an initial volume of $5 \cdot 10^3$ to 10^4 cél.mL⁻¹ at 25 ° C, photoperiod 12 h light: dark and constant aeration. The cultures were monitored by fluorescence in vivo and stopped early stationary phase to obtain the dry biomass and further analysis of the levels of methyl esters of fatty acids (FAME) for gas chromatography. All 10 microalgae studied had palmitic acid content, stearic, palmitoleic and linolenic. The D39Z strain stood out with value of 18.1% of γ -linolenic acid. The D115WC and D132WC strains showing the highest levels of esters with 415,7 mg.g⁻¹ e 391,1 mg.g⁻¹, respectively. The strains D39Z, D115WC and D132WC were selected for cultivations at different temperatures (20 °C, 25 °C and 30 °C) based on the results obtained in the first stage of the study. All strains showed a reduction in the final yield of dry biomass in the cultures at 20 ° C and decreased the total culture time for 13 days and further compounded the final yield of dry biomass in the cultures at 30 ° C, with higher values of 1.020 GL 1 (D39Z). The D115WC at 30 °C showed the highest content of esters with 534.44 mg.g⁻¹ and D39Z strain showed higher protein content, 20 °C, with 62.10%. The D132WC strain was maximum growth rate values (1.12 ± 0.39), protein content (50.87%), carbohydrate (24.14%), lipid (24.78%) and esters (289.55 mg.g⁻¹) at 20 °C, being considered optimum temperature for its cultivation. The FTIR method has shown promise for the detection of lipids and carbohydrates in microalgae.

Keywords: *Scenedesmus acuminatus*, *Planktothrix* sp., FTIR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Curva esquemática representando o aumento da densidade celular em função do tempo e as diferentes fases de crescimento: 1 (fase lag), 2 (fase log), 3 (fase de transição), 4 (fase estacionária) e 5 (fase de declínio). Fonte: Lourenço, 2006, modificado.	14
Figura 2. Esquema de biorrefinaria de microalgas. Modificado de Séston Biotecnologia.	21
Figura 3. Representação de um critério de contagem em câmara de Fuchs-Rosenthal. As células que devem ser contabilizadas são aquelas que estão exclusivamente dentro dos quadrados (bolas pretas) ou apenas aquelas que tocam seus limites, excluindo aquelas que estão exatamente sobre o limite dos quadrantes e aquelas que estão completamente fora (bolas brancas). Lourenço (2006), modificado.	28
Figura 4. Esquema dos diferentes tipos de vibração que ocorre nas ligações entre os átomos, que podem ser detectadas pela análise de FTIR. Reproduzido de Solomons & Fryhle, 2013.	30
Figura 5. Balões inoculados com as cepas D39Z, D115WC e D132WC utilizadas nos experimentos desenvolvidos na câmara de germinação. Fonte própria.	35
Figura 6. Fotografia em microscópio óptico das cepas, aumento de 1000x. A. D26Z, <i>Desmodesmus</i> cf. <i>costato-granulatus</i> ; B. D33Z, <i>Chlorella</i> cf. <i>minutissima</i> ; C. D90Z, <i>Chlorococcum</i> sp.1; D. D97Z, <i>Chlorococcum</i> sp.2.	37
Figura 7. Fotografia em microscópio óptico das cepas, aumento de 1000x. A. D115WC, <i>Scenedesmus acuminatus</i> ; B. D132WC, <i>Clorofícea</i> não identificada; C. D133WC, <i>Lagerheimia longiseta</i>	38
Figura 8. Fotografia em microscópio óptico das cepas, aumento de 1000x. A. D39Z – <i>Planktothrix</i> sp.; B. D46Z - <i>Synechococcus nidulans</i> ; C. D103Z – <i>Synechococcus nidulans</i>	39
Figura 9. Teor de ésteres totais (mg de éster/g de biomassa seca) apresentado pelas 10 cepas estudadas em comparação com a soja.	41

Figura 10. Comparação dos percentuais totais de ácidos graxos das cepas de clorofíceas e cianobactérias estudadas em comparação com a soja, onde SFA: saturados, MUFA: monosaturados, DUFA: diinsaturados, TUFA: triinsaturados e PUFA: polinsaturados.	45
Figura 11. Comparação da média geral dos percentuais de proteínas hidrossolúveis das cepas cultivadas em diferentes temperaturas.	48
Figura 12. Comparação da média geral dos percentuais de carboidratos obtidos nos cultivos das cepas D39Z, D115WC e D132WC em temperaturas diferentes.	49
Figura 13. Teores lipídicos (%) encontrados para as cepas D39Z, D115WC e D132WC cultivadas em três temperaturas diferentes.	50
Figura 14. Espectros de absorbância de IV da cepa D39Z cultivada em diferentes temperaturas.	51
Figura 15. Razões obtidas entre as bandas de carboidrato e lipídeos e as bandas de amida I e amida II para a cepa D39Z nos cultivos em diferentes temperaturas.	52
Figura 16. Espectros de absorbância de IV da cepa D115WC cultivada em diferentes temperaturas.	53
Figura 17. Razões obtidas entre as bandas de carboidrato e lipídeos e as bandas de amida I e amida II para a cepa D115WC nos cultivos em diferentes temperaturas.	53
Figura 18. Espectros de absorbância de IV da cepa D132WC cultivada em diferentes temperaturas.	54
Figura 19. Razões obtidas entre as bandas de carboidrato e lipídeos e as bandas de amida I e amida II para a cepa D132WC nos cultivos em diferentes temperaturas.	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Atribuição das principais bandas e grupos funcionais característicos de espectros de IV de microalgas.	31
Tabela 2. Composição do meio Zarrouk modificado (ZARROUK, 1996).	32
Tabela 3. Composição do meio WC (GUILLARD & LORENZEN, 1972).....	33
Tabela 4. Código no banco de cultura do LARBIM, taxonomia, local de origem, data do isolamento e meio de cultura utilizado das 10 cepas estudadas.	36
Tabela 5. Dados de cultivo das 10 cepas estudadas apresentando: duração do cultivo em dias, velocidade de crescimento na fase log (k), duração da fase exponencial de crescimento em dias e total de biomassa seca produzida (g.L^{-1}).	40
Tabela 6. Diversidade e teor (%) de ésteres metílicos dos ácidos graxos das 10 cepas estudadas em comparação com a soja. NI- ácido graxo não identificado.	43
Tabela 7. Dados de taxa de duplicação (média $k \pm$ desvio-padrão), duração da fase exponencial (log), tempo de cultivo, rendimento final de biomassa seca e quantificação de éster ($\text{mg éster/g biomassa}$) das cepas D39Z, D115WC e D132WC cultivadas em três temperaturas.....	46

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVO.....	15
2.1. OBJETIVO GERAL	15
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
3.1. TAXONOMIA.....	16
3.1.1. CYANOPHYTA (CYANOBACTERIA).....	17
3.1.2. CHLOROPHYTA	18
3.2. USOS E APLICAÇÕES	20
3.2.1. PROTEÍNAS	21
3.2.2. CARBOIDRATOS	22
3.2.3. PIGMENTOS	22
3.2.4. LIPÍDEOS E ÁCIDOS GRAXOS.....	24
3.3. CULTIVO.....	25
3.3.1. NUTRIENTES	25
3.3.2. VITAMINAS	26
3.3.3. FATORES AMBIENTAIS	26
3.4. MEDIDAS DE ACOMPANHAMENTO DE CULTIVO	27
3.4.1. CONTAGEM CELULAR.....	27
3.4.2. FLUORESCÊNCIA <i>IN VIVO</i> E MEDIDAS DE ABSORBÂNCIA	28
3.5. FTIR.....	29
4. MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1. COLETA, ISOLAMENTO E TAXONOMIA.....	31
4.2. ENSAIOS DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA	33
4.3. ANÁLISES QUÍMICAS DA BIOMASSA SECA.....	34
4.4. ENSAIOS EM DIFERENTES TEMPERATURAS	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1. MICROALGAS ISOLADAS	36
5.2. DESCRIÇÕES DAS CEPAS.....	37
5.2.1. CLOROFÍCEAS	37
5.2.2. CIANOBACTÉRIAS	39
5.3. DADOS DE CULTIVO.....	39

5.4. TEOR DE ÉSTERES METÁLICOS DE ÁCIDOS GRAXOS.....	40
5.5. CULTIVO DAS CEPAS SELECIONADAS EM DIFERENTES TEMPERATURAS.....	46
6. CONCLUSÕES.....	56
7. REFERÊNCIAS.....	57

1. INTRODUÇÃO

As primeiras microalgas da Terra estão datadas de 3,5 bilhões de anos, ainda no Éon Arqueano (Silva, 2008). Estas cianobactérias primitivas foram as responsáveis pelo início da formação da atmosfera atual (cerca de 20% de O₂) a partir do processo de fotossíntese (Lee, 1999). Devido à carência de registros fósseis, não é possível reconstituir com precisão a história evolutiva das algas. Porém, supõe-se que tenha havido uma grande diversidade algal que desapareceu ao longo do tempo, sendo as algas atuais apenas os extremos das últimas ramificações (Bicudo *et al.*, 2006).

O termo alga foi proposto oficialmente como uma categoria taxonômica em 1753, por Lineu, em seu livro *Species Plantarum*. O termo alga é considerado popular, pois abrange desde organismos unicelulares até gigantescas formas com talos multicelulares, formação de tecido e divisão de trabalho (Bicudo *et al.*, 2006), tornando esta classificação uma divisão taxonômica não natural, e sim ecológica, já que a única característica em comum dentro deste grupo é a autotrofia (Calijuri *et al.*, 2006).

As algas ocorrem numa enorme variedade de ambientes situados em praticamente todo o globo (Bicudo *et al.*, 2006), exceto em regiões arenosas desérticas (Bicudo & Bicudo, 1970). As algas fotossintetizantes e as cianobactérias constituem o chamado fitoplâncton, formando a base da cadeia alimentar para os organismos heterotróficos (zooplâncton) dos oceanos e corpos d'água doces (Raven *et al.*, 2007).

O principal meio de produção de alimento pelas algas é a fotossíntese, processo onde há a síntese de metabólitos essenciais, como os carboidratos, a partir do gás carbônico (CO₂) e energia luminosa (Bicudo *et al.*, 2006). Atualmente, o fitoplâncton marinho absorve em torno de 50% de todo o CO₂ atmosférico resultante de atividades humanas (ex. queima de combustíveis fósseis) devido à formação de carbonato de cálcio, durante o processo de fotossíntese, exercendo papel fundamental no ciclo do carbono (Raven *et al.*, 2007).

As microalgas possuem diversas aplicações, desde seu uso na alimentação humana e animal, e extração de compostos para indústria farmacêutica e cosmética, até como indicadores ambientais (Lourenço, 2006). Majoritariamente é necessário o cultivo prévio da microalga em sistemas abertos ou fechados para posterior extração dos compostos de interesse.

A ferramenta de maior importância para a produção de biomassa algal é sem dúvidas o cultivo, que estimula o crescimento de determinada espécie, provê informações sobre o seu ciclo de vida, e direciona sua utilização dentre as diversas aplicações comerciais (Lourenço, 2006).

Segundo Lourenço (2006) um cultivo de microalgas pode apresentar até cinco fases de crescimento: fase de indução do crescimento (*lag*), fase exponencial (*log*), fase de transição, fase estacionária, e fase de declínio (Figura 1).

A fase de indução do crescimento ou de adaptação é a fase onde as células recém-inoculadas no meio de cultura se adaptam a este novo ambiente, geralmente ocorre aumento da biomassa, porém com variações imperceptíveis. A duração desta fase depende principalmente da diferença entre as condições do inoculo e as condições experimentais, podendo permanecer desde algumas horas até dias. Entretanto, quando o inoculo utilizado é ainda novo, as condições experimentais são semelhantes às do inoculo, ou ainda, se as células da espécie utilizada forem bem condicionadas aos parâmetros experimentais, esta fase pode não ser percebida, pois há o crescimento imediato do cultivo após a inoculação.

A fase exponencial (*log*) pode ser iniciada logo após o inoculo da espécie estudada no meio de cultura, quando não há a fase de adaptação, ou pode suceder esta. A duração desta fase é influenciada por diversos fatores como aeração, temperatura e pH, mas principalmente pela disponibilidade de nutrientes essenciais (Fe, Mn, Zn, Co, etc), da luz e da densidade celular inicial do inoculo, geralmente quanto menor o inoculo inicial maior é a duração da fase exponencial. Durante a fase *log* há o aumento da excreção de compostos orgânicos, podendo haver diferenças fisiológicas e bioquímicas nas células quando comparadas ao início desta fase. Esta fase é finalizada quando há a depleção de algum nutriente essencial, nitrogênio ou fósforo, ou ainda quando ocorre o auto-sombreamento devido à elevada densidade celular no meio de cultura, verificando-se então diminuição na taxa de crescimento da cultura, entrando na fase de transição.

A fase de transição é difícil de ser marcada claramente, pois se confunde com a fase exponencial e estacionária. Esta fase pode durar alguns dias, possui grande quantidade de biomassa, porém o estado fisiológico celular é menos favorável ao crescimento do que na anterior (*log*).

A fase estacionária é o momento em que o cultivo atinge rendimento celular final máximo, ou seja, maior número de células por mililitro de cultivo dentro das condições

experimentais empregadas. Esta fase geralmente é a mais longa de um cultivo, algumas espécies de microalgas mais resistentes, como as do gênero *Dunaliella* e *Synechococcus*, continuam viáveis nesta fase de crescimento por até vários meses. As taxas de crescimento verificadas durante a fase estacionária é um balanço da duplicação de algumas células e da morte de outras. Nesta fase o auto-sombreamento atinge seus maiores valores, e os nutrientes são exauridos por completo, tornado a cultura incapaz de continuar se duplicando, e consequentemente entrando na fase de declínio.

A fase de declínio é caracterizada pela morte celular e a presença de substâncias auto-inibidoras de crescimento, logo, verifica-se que a taxa de crescimento é negativa. Em culturas não axênicas verifica-se o aumento progressivo no número de bactérias do cultivo.

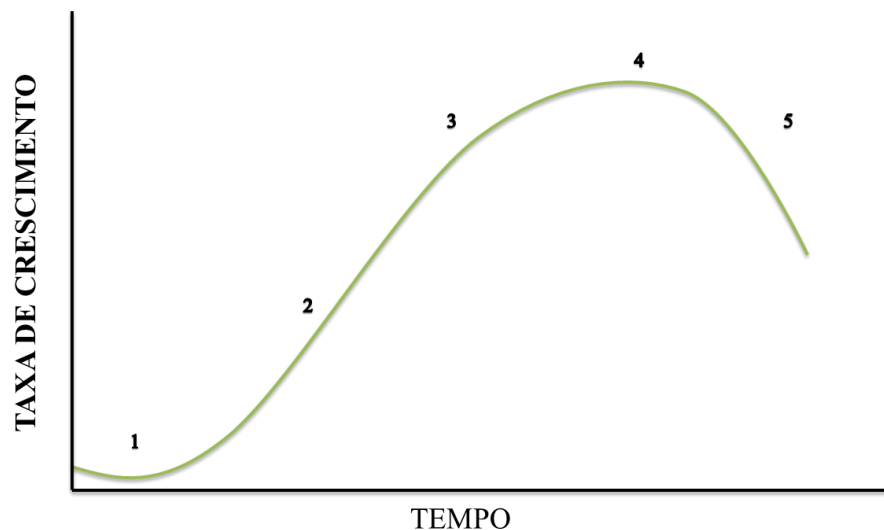


Figura 1. Curva esquemática representando o aumento da densidade celular em função do tempo e as diferentes fases de crescimento: 1 (fase lag), 2 (fase log), 3 (fase de transição), 4 (fase estacionária) e 5 (fase de declínio). Fonte: Lourenço, 2006, modificado.

As mudanças que ocorrem durante o cultivo refletem variações não só na densidade celular, mas também na fisiologia e composição química. Um exemplo desta variação é a elevada quantidade de proteína e nitrogênio total durante a fase exponencial e redução desses valores na fase estacionária (Lourenço, 2006). Já os teores de carboidratos e lipídeos aumentam suas concentrações durante esta fase de crescimento (Fernández-Reiriz *et al.*, 1989).

A identificação e a seleção de espécies e linhagens de microalgas de alto rendimento estão entre as tarefas mais essenciais para o desenvolvimento de pesquisas que visam utilizá-las em grande escala (Benemann, 2013).

Benemann (2013) ressalta algumas vantagens da utilização das microalgas para diversos fins como produção de biodiesel, proteína para ração animal e pigmentos utilizados nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica, dentre as quais podem ser citadas:

- Assimilam maior CO₂ quando comparadas com as plantações de eucalipto.
- Possuem alta produtividade por área quando comparadas com as plantas utilizadas atualmente para produção de biodiesel.
- Podem ser cultivadas em água não potável, como águas salinas e efluentes agroindustriais, não competindo assim com o abastecimento de água para uso humano ou animal.
- Também podem ser cultivadas em áreas não mais propícias para agricultura, pois crescem em fotobiorreatores fechados ou em raceways não competindo pelo uso da terra destinado à produção de alimentos.

Inúmeras microalgas são potencialmente produtoras para cultivos em larga escala, fazendo-se necessário conhecer suas características químicas, assim como velocidade de crescimento e rendimento final. Diversos fatores podem alterar tais variáveis, como temperatura, salinidade, intensidade luminosa, meio de cultivo e fotoperíodo (Brown *et al.*, 1997). O presente trabalho partiu da hipótese que a temperatura modifica a composição bioquímica das microalgas de água doce, devido sua influência no metabolismo e fisiologia celular.

2. OBJETIVO

2.1. OBJETIVO GERAL

Coletar, isolar, identificar, cultivar e caracterizar cepas de microalgas de água doce quanto à sua capacidade em produzir ésteres metílicos de ácidos graxos e avaliar o rendimento em proteínas, lipídeos e carboidratos das espécies mais promissoras em diferentes temperaturas.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Obter cultivos monoespecíficos de microalgas de água doce coletadas em diferentes tipos de ambientes aquáticos dos estados do Rio Grande do Norte, Paraíba e Bahia.
- b) Identificar ao menor nível taxonômico possível as cepas escolhidas, utilizando critérios morfológicos;
- c) Realizar ensaios laboratoriais de produção de biomassa das espécies isoladas e determinar na biomassa produzida os teores de ésteres metílicos de ácidos graxos e de lipídeos totais;
- d) Selecionar dentre as espécies analisadas aquelas que apresentarem teores de ácidos graxos que tenham importância comercial ou que sejam propícias à produção de biodiesel e realizar ensaios de produção de biomassa em diferentes temperaturas.
- e) Quantificar para cada condição experimental testada os teores de lipídeos totais, ésteres, proteínas hidrossolúveis e carboidratos totais.
- f) Utilizar o método de FTIR como indicativo dos teores de carboidratos e lipídeos e possíveis variações na biomassa das espécies cultivadas em cada uma das condições testadas.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. TAXONOMIA

Existem três tipos básicos de sistemas de classificação dentro da biologia: artificial, natural e filogenético. Dentre estes o método filogenético é o que se aproxima mais da realidade dos organismos, pois se baseia na relação da ancestralidade e descendência (Bicudo *et al.*, 2006).

No começo do século XX eram reconhecidas quatro classes distintas englobando todas as algas: *Chlorophyceae*, *Phaeophyceae*, *Rhodophyceae* e *Cyanophyceae*. Ainda neste período se reconheceu que os caracteres fisiológicos das células vegetativas e a morfologia das células reprodutoras deveriam constituir as bases da taxonomia das algas. Portanto, analisando a composição dos pigmentos nas células vegetativas, a substância de reserva, e a posição dos flagelos foi possível subdividir as algas em 10 classes, incluindo *Euglenophyceae*, *Xanthophyceae*, *Chrysophyceae*, *Bacillariophyceae*, *Dynophyceae* e *Cryptophyceae*, além das quatro já mencionadas (Smith, 1987).

Lee (1999) utilizou características como tipo celular (procarionte ou eucarionte) e tipo de cloroplasto para dividir as algas em nove filos: Cyanophyta, Glaucophyta, Rodophyta, Chlorophyta, Euglenophyta, Dinophyta, Heterokontophyta, Prymnesiophyta (Haptophyta), e Cryptophyta.

Bell & Hemsley (2000) dividiram as algas segundo o conteúdo pigmentar, resultando em três grandes grupos com 13 divisões no total: algas com clorofila *a*: Cyanophyta e Rhodophyta; algas com clorofilas *a* e *b*: Prochlorophyta, Chlorachniophyta, Chlorophyta e Euglenophyta; e algas com clorofilas *a* e *c*: Chrysophyta, Xanthophyta, Bacillariophyta, Phaeophyta, Haptophyta, Dinophyta e Cryptophyta.

Torna-se evidente que dependendo das características adotadas na classificação é possível dividir as algas de diversas formas, sendo necessária a utilização de métodos taxonômicos filogenéticos para identificar os grupos irmãos que existem dentro do grande grupo “algas”.

3.1.1. CYANOPHYTA (CYANOBACTERIA)

O filo Cyanophyta abrange os organismos procariontes conhecidos como cianobactérias (algas verde-azuladas). As cianobactérias são classificadas juntamente com as bactérias, e possuem como grande semelhança a presença do polipeptídeoglucano mureína na parede celular, protegendo contra vírus similares aos bacteriófagos (Bell & Hemsley, 2000).

A taxonomia do grupo é frequentemente revista devido aos avanços nos estudos com sequenciamento de DNA e RNA (Bell & Hemsley, 2000), assim o número real de gêneros e espécies dentro de Cyanobacteria é desconhecido, estima-se que possua cerca de 150 gêneros e 2.000 espécies (Franceschini *et al.*, 2010; Lourenço, 2006). Contudo o Algaebase possui um total de 4.171 espécies e variações descritas atualmente (Guiry & Guiry, 2014).

As cianobactérias podem ser de vida livre, coloniais, e até mesmo se desenvolver sobre ou no interior de outras algas, como epífitas. Algumas espécies podem viver sobre rochas, ou solo úmido com até 1m de profundidade (Smith, 1987). A morfologia das cianobactérias é considerada simples, com células unicelulares raramente excedendo 10 µm de diâmetro (Bell & Hemsley, 2000), coloniais ou filamentosas. Quando as células crescem enfileiradas formam os tricomas, que envolvidos por mucilagem são chamados

de filamentos (Lee, 1999). As cianobactérias também possuem movimentos espontâneos, especialmente dentro de Oscillatoriaceae, podendo ser deslizante, progressivo ou ondular, resultantes da secreção de substâncias mucilaginosas (Smith, 1987).

As cianobactérias fotossintetizantes possuem além da clorofila *a* e carotenoides (principalmente o β -caroteno, mas também ocorre zeaxantina, mixoxantina e outros), pigmentos acessórios chamados genericamente de ficobiliproteínas, podendo ser ficocianina, aloficocianina ou ficoeritrina (Bell & Hemsley, 2000; Raven *et al.*, 2007), e possuem como produto de reserva o glicogênio (Lee, 1999).

Alguns gêneros de cianobactérias são capazes de fixar o nitrogênio por meio de células especializadas, os heterocistos, convertendo o nitrogênio atmosférico em amônia, tornando-o disponível para as reações biológicas. No ambiente marinho destacam-se as espécies *Richelia intracellulares*, uma cianobactéria fixadora de nitrogênio que vive como endofítica obrigatória de diversas diatomáceas como *Rhizosolenia hebetata* (Madhu *et al.*, 2013), *Rhizosolenia styliformis* (Ostenfeld & Schmidt, 1901), *Chaetoceros compressus* (Gómez *et al.*, 2005), *Hemiaulus hauchi* e *Hemiaulus membranaceus* (Heinbokel, 1986; Kimor *et al.*, 1978) e *Rhizosolenia clevei* (Sundström, 1984), e a Oscillatoriaceae *Trichodesmium* (especialmente *T. erythraeum*), que forma densas florações em águas superficiais pobres em nutrientes, em diferentes regiões do globo, inclusive no Brasil (Carvalho *et al.*, 2008; Satô *et al.*, 1963).

Outro tipo de célula especializada que ocorre em cianobactérias das ordens *Nostocales* e *Stigonematales* é o acineto, resistente ao calor e à falta d'água, que permite sua sobrevivência em condições extremas, desfavoráveis (Lee, 1999; Raven *et al.*, 2007).

As cianobactérias se reproduzem de forma assexuada por meio de três processos distintos: por hormogonia, quando os filamentos se fragmentam formando hormogônios, única forma de reprodução do gênero *Oscillatoria*; por formação de endósporos (acinetos), ou por fragmentação colonial (Lee, 1999; Raven *et al.*, 2007).

3.1.2. CHLOROPHYTA

O filo Chlorophyta é formado pelas algas verdes, abrangendo formas unicelulares até talos multicelulares, e inclui cerca de 17.000 espécies, sendo, aproximadamente, 10% marinhas e 90% dulcícolas (Lourenço, 2006; Smith, 1987). Entretanto, atualmente

o Algaebase relata apenas 5.681 espécies, que estão basicamente nas classes Chlorophyceae (3.152 espécies) e Ulvophyceae, com 1.613 espécies (Guiry & Guiry, 2014). Embora a grande maioria seja aquática, podem-se encontrar espécies em simbiose com fungos, formando líquens e até mesmo espécies dos gêneros *Chlamydomonas* e *Chloromonas* crescendo sobre a neve (Raven *et al.*, 2007).

As algas verdes são desta cor, pois possuem as clorofilas *a* e *b* que se sobressaem sobre os demais pigmentos acessórios, podendo haver alterações da coloração devido à presença de carotenoides (Smith, 1987; Raven *et al.*, 2007), deste, os mais abundantes são: β -caroteno, luteína, violaxantina, zeaxantina e neoxantina (Lee, 1999; Bell & Hemsley, 2000). As clorofíceas possuem como substância de reserva o amido, que é armazenado no interior dos pirenóides (Smith, 1987; Raven *et al.*, 2007).

Quanto as morfologias celulares podem ser flageladas, cocóides, filamentosas ou raramente foliáceas, e a reprodução pode ser assexual ou sexual, por isogamia, anisogamia ou oogamia (Bell & Hemsley, 2000).

Atualmente a divisão Chlorophyta possui nove classes (Guiry & Guiry, 2014), dentre estas, a classe Chlorophyceae é a mais abundante e merece destaque. Esta classe possui ordens bem definidas: Volvocales, Tetrasporales, Chlorococcales, Chaetophorales e Oedogoniales (Bell & Hemsley, 2000).

Na ordem Volvocales estão dois gêneros importantes, o gênero *Chlamydomonas* que contém cerca de 400 espécies, sendo a maioria de água doce (Bell & Hemsley, 2000); e o gênero *Dunaliella*, com representantes capazes de suportar alta salinidade devido à acumulação do glicerol, o que torna as células alaranjadas em altas intensidades luminosas. Os dois gêneros são objeto de estudo de diversos trabalhos sobre genômica, atividade antioxidante, e até atividade anticancerígena (Blaby *et al.*, 2014; Chankova *et al.*, 2014; Jayappriyan *et al.*, 2013).

Os membros da ordem Chlorococcales em sua maioria são de água doce, porém também ocorrem no ambiente marinho, no solo, como endófitos de plantas vasculares, em simbiose com animais inferiores e até formando líquens (Bell & Hemsley, 2000). Dentre os gêneros com formas unicelulares estão *Chlorella*, um dos gêneros mais estudados (em pesquisa na Science Direct só em 2014 há mais de 1000 trabalhos publicados com este gênero), *Chlorococcum*, e algumas formas cenobiais como *Scenedesmus* e *Pediastrum*.

3.2. USOS E APLICAÇÕES

O cultivo de microalgas permite a obtenção de diversos compostos de interesse para indústria alimentícia, farmacêutica, e cosmética, além disso, as condições de cultivo podem ser alteradas induzindo um maior acúmulo do produto de interesse, por exemplo: pigmento, proteína, carboidrato ou ácidos graxos. Vale ressaltar que uma mesma espécie pode apresentar diferentes perfis químicos de acordo com as condições em que foi cultivada, devido a flexibilidade que as microalgas possuem diante dos substratos que conseguem assimilar, variando consideravelmente os diversos produtos resultantes do seu metabolismo (Bicudo & Bicudo, 1970, Lourenço, 2006).

A utilização mais comum das microalgas é para o fim alimentar humano e animal, sendo o único uso até os anos 1940. As microalgas são utilizadas na alimentação direta ou indireta de espécies de peixes, crustáceos e outros organismos de interesse econômico, podendo se destacar o uso dos gêneros de microalgas *Arthrospira*, *Chlorella*, *Scenedesmus* e *Dunaliella* (Derner *et al.*, 2006; Lourenço, 2006).

Algumas algas podem ser utilizadas na recuperação de sistemas aquáticos, principalmente quando envolve íons metálicos e alguns compostos orgânicos, já que conseguem retirar esses elementos químicos do meio aquoso (Vidotti & Rollemberg, 2004). Há também a possibilidade de uso das microalgas como bioindicadores de poluição orgânica em corpos d'água, pelo estudo da abundância relativa e riqueza das espécies, assim como pela formação de florações (Yucra & Tapia, 2008).

As microalgas podem ser utilizadas para incrementar a ração de animais produtores de carne e ovos, aumentando o teor nutricional desses produtos. Já foi confirmado que aves que foram suplementadas nutricionalmente com microalgas, produziram ovos com casca mais forte, diminuindo as perdas durante seu transporte. Porém, a utilização de microalgas como enriquecimento nutricional esbarra no obstáculo do custo envolvido na obtenção da biomassa seca, mesmo que o produtor aumente seus lucros no produto final vendido, devendo-se procurar maneiras de baratear tal custo (Vitta, 2014).

Atualmente pesquisadores do Brasil e do mundo tem se dedicado a estudar o uso da biomassa microalgal na geração de diversos biocombustíveis, como biodiesel, (Abou-Shanab *et al.*, 2011; Cardoso *et al.*, 2011; Franco *et al.*, 2013), biogás (Passos *et al.*, 2013), bioquerosene (Solazyme, 2014) e bioetanol (Miranda, 2011; Möllers *et al.*,

2014) a partir da produção de diferentes bioprodutos como lipídeos, proteínas e carboidratos.

A produção de biocombustíveis a partir de microalgas também esbarra no elevado custo total, desde o cultivo até obtenção do produto final (biodiesel, biogás, etc). Para a redução do valor gasto no cultivo da microalga em larga escala pode-se unir à produção de biocombustíveis o tratamento de águas residuais; a utilização de efluentes domésticos e industriais, como a vinhaça resultante da produção de etanol a partir da cana-de-açúcar (Oliveira, 2011); o reaproveitamento do meio de cultura (Cunha, 2014; Oliveira, 2009) e principalmente adotando o conceito de biorrefinarias (Figura 2), ou seja, indústrias que produzem não só biocombustíveis e energia, mas também subprodutos de alto valor agregado, tornando mais viável e competitivo tais produtos (Bastos, 2012; Borges, 2010).

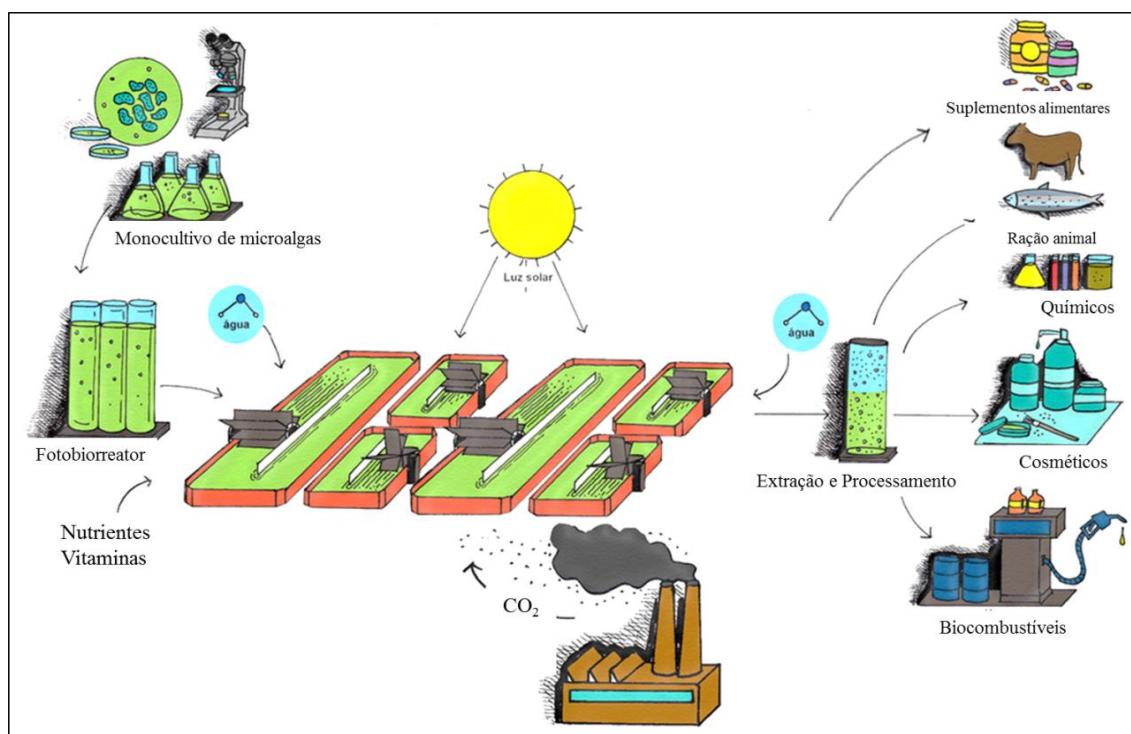


Figura 2. Esquema de biorrefinaria de microalgas. Modificado de Séston Biotecnologia.

3.2.1. PROTEÍNAS

Há uma crescente procura por fontes de proteínas não convencionais (unicelular) provenientes de microalgas e tentativas de diminuição do uso da terra para fim pecuário. Dentre as grandes vantagens do uso de microalgas como fonte alternativa de proteína está a demanda de pequena área para o cultivo, capacidade de assimilar tanto carbono

inorgânico como orgânico e conter de 40 a 70% de teor proteico dependendo da espécie e condições empregadas no cultivo (Bertoldi *et al.*, 2008), podendo se destacar os gêneros *Chlorella*, *Scenedesmus* e *Arthrospira* (Gava, 1998).

A *Arthrospira* (antiga *Spirulina*) é uma das microalgas mais cultivadas em larga escala no mundo, com seu cultivo e consumo iniciado pelos povos indígenas do México e da África há muitos séculos atrás (Lourenço, 2006). A *Spirulina* já é utilizada como suplemento alimentar humano por meio de cápsulas diárias e pode ser adicionada em diversos alimentos tornando-os mais enriquecidos (Barros, 2010; Carvajal, 2009).

3.2.2. CARBOIDRATOS

Os carboidratos podem ser definidos como açúcares e compostos relacionados que contém na sua composição carbono, hidrogênio e oxigênio (Alberts *et al.*, 1997), como por exemplo, glucose, manose e galactose. Os carboidratos produzidos por microalgas são de grande interesse da indústria alimentícia e podem ser encontrados na forma de glicose, dissacarídeos, amido e outros polissacarídeos (Spolaore *et al.*, 2006). A quantidade e qualidade destes carboidratos na constituição das microalgas são importantes na determinação de seu valor nutricional (Lourenço, 2006).

Além do valor nutricional dos carboidratos, também há a possibilidade de produzir bioetanol a partir da fermentação desses compostos pela ação, principalmente, da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Schmitz *et al.*, 2012). Estima-se que microalgas do gênero *Spirulina* e da espécie *Porphyridium purpureum* consigam produzir entre 46.760 e 140.290 L/ha de etanol, um rendimento superior ao encontrado em vegetais como milho e beterraba, com valores entre 3.460 a 4.020 L/ha e 5.010 a 6.680 L/ha, respectivamente (Chaudhary *et al.*, 2014). A empresa *Algenol Biofuels*, localizada na Flórida, já produz bioetanol a partir de cianobactérias, com produção de 100.000 gal/ano, porém ainda em escala piloto (Bastos, 2012).

3.2.3. PIGMENTOS

As algas possuem quatro tipos de clorofila: *a*, *b*, *c* (*c*₁ e *c*₂) e *d*. A clorofila *a* é responsável por até 3% da biomassa seca das microalgas, sendo assim o pigmento fotossintetizante mais abundante (Bell & Hemsley, 2000). As clorofilas *b*, *c* e *d* aumentam o total de luz absorvida pela alga, podendo ser consideradas como pigmentos

acessórios. Contudo, as clorofilas não possuem valor nutricional, ao contrário dos carotenoides, como o β -caroteno e a astaxantina (Lourenço, 2006).

Os carotenoides são pigmentos que podem ser amarelo, laranja, ou vermelho que podem estar livres dentro da célula ou dentro de plastídios (Lee, 1999). Estes podem ser divididos em duas classes: carotenos, substâncias formadas apenas de hidrogênio e carbono (ex. β -caroteno) e xantofilas, substâncias que além de hidrogênio e carbono, possuem oxigênio em sua estrutura (ex. fucoxantina). Por serem compostos com alta instauração fatores como calor, luz e ácidos podem promover ligeira perda de cor e atividade pró-vitâmica (Lourenço, 2006).

Os carotenoides mais pesquisados são o β -caroteno, astaxantina, cantaxantina, toruleno e licopeno, sendo este último responsável pela prevenção da oxidação do LDL, redução de doenças coronarianas, além de pesquisas que sugerem a redução de câncer de próstata, pulmão, pele e bexiga a partir do consumo deste carotenoide. Já o β -caroteno funciona como precursor da vitamina A, enquanto que a astaxantina participa da pigmentação de diversos animais, como camarão, siri e lagosta (Valduga *et al.*, 2009; Lourenço, 2006).

Os carotenoides podem ser utilizados como corantes naturais de alimentos e rações, como matéria prima para síntese de outras substâncias, principalmente a vitamina A, e devido sua atividade antioxidante (Lourenço, 2006). As microalgas cultivadas em escala industrial para obtenção de carotenoides são principalmente a *Dunaliella* sp., para extração de β -caroteno e *Haematococcus* sp. para extração de astaxantina (Valduga *et al.*, 2009).

Além das clorofilas e carotenoides, as microalgas possuem outros pigmentos acessórios chamados genericamente de ficobiliproteínas, podendo ser ficocianina (coloração azul), aloficocianina (coloração verde azulada) ou ficoeritrina (coloração vermelha) (Bell & Hemsley, 2000; Raven *et al.*, 2007). As ficobiliproteínas são formadas por duas partes (proteína e ficobilina) unidas por ligações covalentes. Elas ampliam o espectro de captação de luz pela fotossíntese, além de constituir uma reserva de nitrogênio (Lourenço, 2006). Estes pigmentos são armazenados em regiões específicas chamadas de ficobilissomos (exceto em Cryptophyta) e mudam suas proporções nas células em detrimento da luz utilizada durante o cultivo (Lee, 1999).

As ficobiliproteínas podem ser utilizadas comercialmente como corantes naturais de alimentos, em substituição aos artificiais, na indústria cosmética e até como corantes

fluorescentes para citometria de fluxo e ensaios imunológicos. As principais fontes são microalgas do gênero *Spirulina*, *Porphyridium* e *Rhodella* (Lourenço, 2006).

3.2.4. LIPÍDEOS E ÁCIDOS GRAXOS

Os lipídeos exercem diversas funções biológicas, como componentes da membrana celular e de várias organelas, controle sobre o movimento de substâncias para interior celular, isolantes térmicos e reservas de energia, sendo compostos de glicerol, açúcares ou bases esterificadas em ácidos graxos saturados e insaturados (Vidotti & Rollemberg, 2004; Lourenço, 2006).

Dentre os ácidos graxos presentes nas microalgas, os da família ômega 3 (ω -3) e ômega-6 (ω -6) são particularmente interessantes, pois estão relacionados com a diminuição dos níveis de colesterol e não são produzidos pelo organismo humano, sendo assim considerados ácidos graxos essenciais (Coqueiro *et al.*, 2011; Silva, 2008).

Os ácidos graxos de cadeia longa, eicosapentanóico (EPA), docosahexaenóico (DHA) e araquidônico (AA) são de especial interesse por apresentarem alto valor nutritivo. Segundo Lourenço (2006) as diatomáceas juntamente com as priminesiofíceas, criptomônadas, e eustigmatofíceas são os grupos mais ricos em EPA e DHA (5-35% do total de ácidos graxos), por outro lado, as clorofíceas são consideradas deficientes em ambos, com valores abaixo dos 3% do total de ácidos graxos. O ácido linoleico é precursor do ácido araquidônico e prostaglandinas (Costa *et al.*, 2006).

O DHA é um componente estrutural abundante na massa cinzenta do cérebro e da retina dos olhos, além de compor o tecido cardíaco, e ser considerado eficiente no tratamento da infertilidade masculina associada ao dano de membrana e do DNA espermático, logo já está sendo produzido comercialmente em grandes quantidades (Álvarez, 2011; Lourenço, 2006).

Os ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) ω -3 e ω -6 são amplamente investigados, principalmente no que toca ao enriquecimento nutricional (Lemale, 2014; Palacios *et al.*, 2014) visando à prevenção e tratamento de diversas doenças (Álvarez, 2011; Fernández *et al.*, 2011). Estas duas famílias de ácidos graxos devem estar em equilíbrio na dieta, já que os teores de ω -6 são influenciados pelos teores de ω -3. Já se tem relatado que a ingestão de ômega-3 beneficia o organismo humano devido sua ação anti-inflamatória em processos degenerativos (ex. artrite reumática) e nos quadros inflamatórios após atividades físicas intensas (Coqueiro *et al.*, 2011).

Além do grande potencial das microalgas na produção de diferentes lipídeos e sua utilização na indústria alimentícia, também há a possibilidade de uso desses lipídeos para produção de biodiesel, visto que atualmente se busca a redução do uso de combustíveis fósseis e substituição por combustíveis renováveis, não tóxicos e com maior biodegradabilidade, além de outros fatores (Oliveira, 2009).

A produção de biodiesel a partir de microalgas deve seguir vários requisitos importantes, principalmente avaliar o rendimento da transesterificação direta, na forma do teor de ésteres e os tipos de ácidos graxos que compõem as amostras. A norma técnica EN14214 (Costenoble *et al.*, 2008) estabelecida pelo Comitê Europeu de Normalização (Comité Européen de Normalisation - CEN) determina que o limite máximo admissível para o teor do ácido linolênico seja de 12%, enquanto que o teor máximo aceitado para ácidos graxos com mais de três duplas ligações seja de 1%. Vale também a comparação entre os valores de ésteres obtidos em relação à soja, principal matéria-prima utilizada atualmente para produção de diesel.

3.3. CULTIVO

3.3.1. NUTRIENTES

Lourenço (2006) relata que os nutrientes adicionados no meio de cultura e suas respectivas proporções podem variar de espécie para espécie, dependendo da importância que exerce no desenvolvimento de cada microalga. Os elementos químicos foram catalogados em essenciais ou não, porém um elemento pode ser essencial para uma microalga e não o ser para outra, não havendo assim um número exato de elementos essenciais para microalgas. Contudo, os elementos carbono, nitrogênio, hidrogênio, oxigênio, fósforo, magnésio, cobre, zinco, e molibdênio são considerados inteiramente essenciais para qualquer alga (Lourenço, 2006).

Os nutrientes podem ser divididos em duas categorias (macronutrientes ou micronutrientes) de acordo com a quantidade necessária pela microalga para os diversos processos bioquímicos que realiza.

3.3.1.1 MACRONUTRIENTES

Estão dentro desta categoria os elementos que são necessários em concentrações da ordem de centenas ou milhares de $\mu\text{g.g}^{-1}$ de massa seca. As funções dos macronutrientes são diversas, vão desde constituintes de biomoléculas e de membranas

até regulação do metabolismo. Lourenço (2006) ressalta que cada macronutriente geralmente possui várias funções nas algas, e sua escassez pode afetar diferentes processos no organismo. Entre os macronutrientes (C, H, O, N, P, S, K, Mg, Si, Fe) podemos destacar o carbono, nitrogênio, fósforo, magnésio e ferro, por serem constituintes de carboidratos, proteínas, lipídeos, pigmentos fotossintetizantes e alguns (P e Fe) participarem das reações de trocas energéticas e respiração celular.

3.3.1.2. MICRONUTRIENTES

Estão nesta classe os elementos necessários para as algas na concentração de algumas unidades a dezenas de $\mu\text{g.g}^{-1}$ de massa seca e são em sua maioria elementos metálicos. Os micronutrientes (Mn, Mo, Co, B, V, Zn, Cu, Se) possuem genericamente duas grandes funções nas células das microalgas: participam da estrutura e atividade de várias enzimas, e participam da estruturação de algumas organelas (ribossomos). Lourenço (2006) ressalta que alguns micronutrientes quando em concentrações elevadas em cultivos podem ser tóxicos às microalgas, como é o caso do cobre e do zinco. Vale salientar que o cobalto é um elemento fundamental para microalgas, pois é um dos constituintes da vitamina B₁₂ (cianocobalamina), uma das três vitaminas mais importantes para o desenvolvimento celular.

3.3.2. VITAMINAS

As microalgas, em sua maioria, sintetizam as vitaminas que necessitam, porém em cultivos é importante acrescentar as três vitaminas fundamentais: cianocobalamina, tiamina e biotina (Lourenço, 2006). As funções das vitaminas em microalgas não estão totalmente elucidadas (Croft *et al.*, 2005), sabe-se que podem agir como coenzimas e auxiliar no transporte de CO₂.

3.3.3. FATORES AMBIENTAIS

A temperatura é um dos fatores que mais afetam a taxa metabólica das microalgas, tornando o uso de incubadoras que controlam este parâmetro de vital importância para estabilidade dos experimentos e maior reprodutibilidade e previsibilidade das respostas das espécies (Lourenço, 2006). Este parâmetro é decisivo para o crescimento das microalgas, podendo afetar a morfologia celular (Latala, 1991), a produção de toxinas de cianobactérias, como as do gênero *Oscillatoria*, e

principalmente sua composição química, como teores de proteínas, lipídios e carotenoides (Renaud *et al.*, 1995; Richmond, 2004; Sivonen, 1990). Genericamente pode-se dizer que temperaturas baixas ($\pm 15^{\circ}\text{C}$) tendem a diminuir a velocidade e taxa de crescimento das microalgas marinhas, assim como os seus teores proteicos (Cook, 1963; Thompson *et al.*, 1992).

3.4. MEDIDAS DE ACOMPANHAMENTO DE CULTIVO

3.4.1. CONTAGEM CELULAR

A contagem direta por microscopia é a metodologia mais tradicional de monitoramento do crescimento de um cultivo de microalga (Lourenço, 2006). Esta técnica é usada para quantificar a densidade celular presente em determinada unidade de volume, com resultado expresso em número de células por mililitro de cultivo ($\text{cél}.\text{ml}^{-1}$), fazendo-se necessário o uso de microscópio completo equipado com objetivas de vários aumentos, com capacidade de aumento total de no mínimo 400x.

Para a realização de tal técnica é imprescindível o uso de hemocitômetros, que são câmaras de contagem desenvolvidas originalmente para quantificação de células sanguíneas (hemo), mas há décadas veem sendo utilizadas para quantificar desde microalgas até grãos de pólen (Lourenço, 2006). Tais câmaras de contagem são dotadas de áreas de contagem gravadas definindo um volume exato.

Os dois tipos de hemocitômetros convencionalmente utilizados para contagem de microalgas são: câmara de Neubauer e de Fuchs-Rozenthal, usadas principalmente para formas esféricas ou colônias, cenobiais, pequenas, mas também se pode utilizar a câmara de Sedgewick-Rafter que possui um volume maior (cerca de 1 ml) para as formas maiores e filamentosas, e as câmaras de contagem de Uthermhöl usadas em microscópio invertido, que se mostram adequadas para contagens de organismos do fitoplâncton em geral.

Nas contagens sempre é necessário adotar procedimentos que diminuam a margem de erro, os quais podem incluir:

- Fixação da lamínula ao hemocitômetro para garantia do controle do volume;
- Controle do fluxo do preenchimento da câmara de contagem, não podendo ser nem tão devagar nem tão rápido para não interferir na distribuição das células na área de contagem;

- Aguardar decantação por alguns minutos quando se estuda células pequenas, ao contrário haverá células em diferentes profundidades dificultando a contagem correta;
- Morte e fixação das células anteriormente à contagem, imprescindível no caso de células flageladas.
- Homogeneização dos frascos que contém a amostra anteriormente à retirada da alíquota para contagem, por meio de agitação vigorosa com Vortex ou manualmente;
- Diluição cuidadosa da amostra, quando esta apresentar-se extremamente densa, utilizando após a contagem multiplicação dos valores correspondentes à proporção da diluição.

Nos casos dos hemocitômetros, os valores de densidade celular são obtidos por meio de fatores de multiplicação que levam em conta a área de contagem utilizada e o volume total da câmara. É importante que se determine os critérios de contagem antes de fazê-lo, para que seja adotado durante todo o estudo, principalmente em relação às células que vão ou não serem contabilizadas (Figura 3).

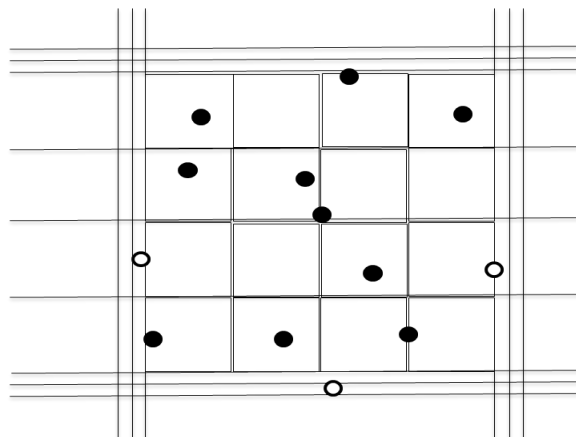


Figura 3. Representação de um critério de contagem em câmara de Fuchs-Rosenthal. As células que devem ser contabilizadas são aquelas que estão exclusivamente dentro dos quadrados (bolas pretas) ou apenas aquelas que tocam seus limites, excluindo aquelas que estão exatamente sobre o limite dos quadrantes e aquelas que estão completamente fora (bolas brancas). Lourenço (2006), modificado.

3.4.2 FLUORESCÊNCIA *IN VIVO* E MEDIDAS DE ABSORBÂNCIA

A determinação da clorofila *a* por fluorescência *in vivo* é considerada a mais sensível das análises. Esta metodologia é indicada quando a medida de clorofila é um dado comparativo em amostras unialgais, principalmente para medidas de crescimento (Calijuri, 2006). As respostas de fluorescência são proporcionais à densidade de células vivas da cultura, e tem como vantagem a subtração dos valores das células mortas (Lourenço, 2006).

As medidas de fluorescência *in vivo* são realizadas fluorômetros, equipamentos que permitem controlar a incidência luminosa (baixo comprimento de onda) sobre a amostra. Os valores obtidos aumentam proporcionalmente de acordo com o crescimento do cultivo (densidade celular). Esta metodologia é a segunda mais utilizada para a obtenção de curvas de crescimentos de cultivos, ficando atrás apenas da contagem celular (Lourenço, 2006).

Outra metodologia utilizada para o acompanhamento do crescimento celular de microalgas é a medida de absorbância por densidade ótica, utilizando um espectrofotômetro. Devido à presença de pigmentos e carotenoides nas microalgas é necessário selecionar um comprimento de onda que não seja influenciado por esses compostos, e meça apenas a obstrução física da luz pelas células da amostra, assim a faixa de 570 nm é a mais indicada. Esta análise é alterada devido às células mortas ou fragmentadas na cultura, a presença de bactérias em culturas não axênicas e a interferência dos pigmentos, tornando-a pouco utilizada (Lourenço, 2006).

3.5. FTIR

A análise de infravermelho com transformada de Fourier (IVTF ou FTIR, em inglês) é uma técnica experimental rápida, confiável e barata que pode mostrar evidências de vários grupos funcionais, podendo, inclusive, ser utilizada na taxonomia de microrganismos (Davis & Mauer, 2010). Esta técnica se baseia no fato de que átomos e grupos de átomos vibram conforme absorvem radiação eletromagnética na região do infravermelho (IV) que se encontra entre a faixa do visível e das microondas, localizada entre 14.290 e 200 cm^{-1} . Visto que os grupos funcionais das moléculas orgânicas são compostos de arranjos específicos de átomos ligados, a absorção da radiação IV ocorrerá em frequências também específicas, características dos tipos de ligações e átomos presentes nos grupos funcionais de determinada molécula (Pepino, 2011; Solomons & Fryhle, 2012). As vibrações entre os átomos podem ocorrer

genericamente de duas formas: estiramento, quando dois átomos unidos por ligação covalente se movem como se estivessem unidos por uma mola; e deformação angular, quando três átomos vibram em um movimento tipo tesoura ou tipo torção (Figura 4).

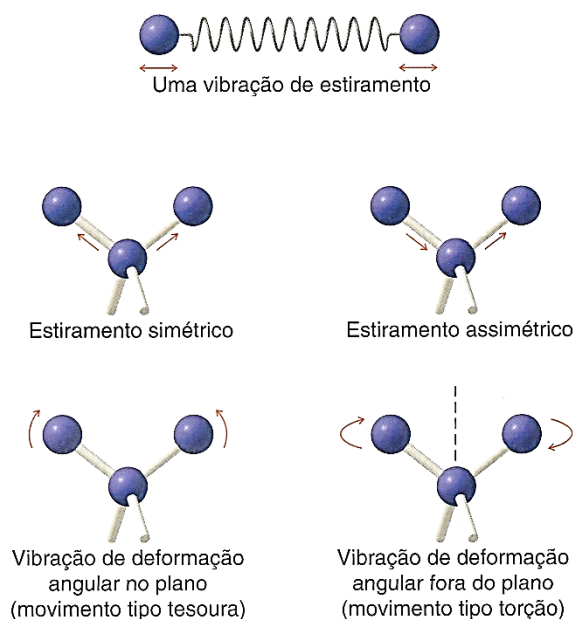


Figura 4. Esquema dos diferentes tipos de vibração que ocorre nas ligações entre os átomos, que podem ser detectadas pela análise de FTIR. Reproduzido de Solomons & Fryhle, 2012.

A técnica de FTIR é realizada em um espectrômetro de IV que opera através da passagem de um feixe de radiação IV pela amostra e compara a radiação transmitida através da amostra com a transmitida na ausência da amostra, logo, quaisquer frequências absorvidas pela amostra se tornarão perceptíveis, gerando um gráfico com a relação da absorbância ou transmitância em função da frequência ou comprimento de onda, onde podemos observar os picos ou bandas característicos desta metodologia (Solomons & Fryhle, 2012).

Segundo Yu *et al.* (2005), as faixas de 1650 cm^{-1} e 1550 cm^{-1} detectam as bandas de amida I e amida II de proteínas, respectivamente, ressaltando que a banda 1550 cm^{-1} consiste de vibrações da ligação N-H (60%) juntamente com vibrações C-N (40%). Já as bandas características de lipídeos são as da faixa $2800\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ e em torno de 1740 cm^{-1} , que podem ser utilizadas para caracterizar mudanças no conteúdo lipídico da biomassa microalgal (Meng *et al.*, 2014).

Os açúcares que compõem os carboidratos possuem ligações C-C, O-H e C-O, e dependendo da ligação e tipo de açúcar presente na amostra a sua detecção no IV pode

oscilar dentro da faixa de 1180 a 950 cm^{-1} (Yu *et al.*, 2005). A tabela 1 reúne as bandas utilizadas para detecção dos principais grupos funcionais de uma microalga.

Os valores de FTIR são analisados de acordo com as relações das bandas de interesse (lipídeo, carboidrato) com uma banda de proteína, porém alguns autores utilizam a de amida I (Dean *et al.*, 2010; Meng *et al.*, 2014), enquanto que outros preferem adotar a de amida II (Stehfest *et al.*, 2005; Osiro *et al.*, 2000). Neste estudo utilizaram-se ambas as bandas de amida, para fins de comparação.

Tabela 1. Atribuição das principais bandas e grupos funcionais característicos de espectros de IV de microalgas.

Banda no IV (cm^{-1})	Grupo funcional	Referências para microalgas
~2930	Ácidos graxos (C-H)	Meng <i>et al.</i> , 2014
~1740	Éster de lipídeo (C=O)	Giordano, 2001
~1650	Amida I (C=O)	Stehfest <i>et al.</i> , 2005
~1550	Amida II (N-H)	Stehfest <i>et al.</i> , 2005
~ 1074	Polissacarídeos (C-O-C)	Yu <i>et al.</i> , 2005

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. COLETA, ISOLAMENTO E TAXONOMIA

Foram realizadas coletas em diferentes corpos d'água doce dos estados da Paraíba (Cuité, Frei Martinho, Acauã, João Pessoa), Bahia (Chapada Diamantina), e Rio Grande do Norte (Açude Malhada Limpa), entre os anos 2009 e 2012, porém todos os ensaios foram realizados em 2014. As amostras foram transportadas ao LARBIM em garrafas PET de 500 mL em condições herméticas, para posterior inoculação (cerca de 5 mL) em balões contendo 150 mL de meio WC (Guillard & Lorenzen, 1972) ou 150 mL de meio Zarrouk (Zarrouk, 1996), conforme formulações apresentadas nas tabelas 2 e 3. Os meios de cultura foram constituídos em água destilada autoclavada deixada em repouso por 24 horas em temperatura ambiente para re-oxigenação.

Após constatar crescimento de células em cada balão procedia-se o isolamento das microalgas desejadas por diluição sucessiva usando micropipetas capilares (Lourenço, 2006), inoculando-se cada célula individualmente em tubos de ensaio contendo meio de cultura. As microalgas isoladas foram observadas em microscópio e reisolamentos sucessivos foram efetuados sempre que necessário, até que culturas puras fossem

obtidas, sendo as mesmas codificadas e incorporadas ao Banco de Cultura de Microalgas do LARBIM/LEA/UFPB. Os cultivos foram mantidos em câmara de cultura climatizada ($25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) com sistema de iluminação fornecido por lâmpadas fluorescentes tipo luz-do-dia, e fotoperíodo de 12 horas controlado por fotocélula externa.

A identificação taxonômica de cada cepa isolada foi realizada utilizando características morfológicas mediante a observação das células com auxílio de fotos obtidas em microscópio ótico Leica DM2500 acoplado a câmera Leica DFC295, juntamente com uso de bibliografia especializada (Bellinger & Sigeo, 2010; Chodat, 1902; Gomont, 1892; Komárek & Komárková, 2004) e buscas em sites específicos na internet, a exemplo do Algaebase e Cyanobase.

Tabela 2. Composição do meio Zarrouk modificado (Zarrouk, 1996).

Solução Mista		
Reagente	Fórmula	Massa (g)
Nitrato de Cobalto	$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,049
Cloreto de Manganês	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,144
Sulfato de Zinco	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,882
Sulfato de Cobre	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,157
Trióxido de Molibdênio	MoO_3	0,071
Água destilada autoclavada		100 ml
Solução de Ácido Bórico		
Ácido Bórico	H_3BO_3	1,142 g
Água destilada autoclavada		100 ml
Solução de Sulfato Ferroso		
Sulfato Ferroso	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g
Água destilada autoclavada		100 ml
Composição do Meio		
Reagente	Fórmula	Medida
Nitrato de Potássio	KNO_3	3,75 g
Cloreto de Sódio	NaCl	8,25 g
Sulfato de Magnésio	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,375 g
Fosfato de Potássio	K_2HPO_4	0,375 g
Cloreto de Cálcio	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,145 g
EDTA	Na_2EDTA	0,32 g
Sol. Sulfato Ferroso		5 ml
Sol. Ácido Bórico		5 ml
Bicarbonato de Sódio	NaHCO_3	75 g
Carbonato de Sódio	Na_2CO_3	10 g
Solução Mista		5 ml
Água Destilada		5 L

Tabela 3. Composição do meio WC (Guillard & Lorenzen, 1972).

Solução Estoque		
Reagente	Fórmula	Massa (g)
Cloreto de Cálcio	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	36,8
Sulfato de Magnésio	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	37
Bicarbonato de Sódio	NaHCO_3	12,6
Fosfato de Potássio	$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	11,4
Nitrato de Sódio	NaNO_3	85
Água destilada autoclavada		1 L
Solução de Silicato		
Reagente	Fórmula	Massa (g)
Metasilicato de Sódio	$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	21,2
Água destilada autoclavada		1 L
Solução de Micronutrientes		
Reagente	Fórmula	Massa (g)
EDTA	Na_2EDTA	4,36
Cloreto Férrico	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	3,15
Sulfato de Cobre	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,01
Sulfato de Zinco	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,022
Cloreto de Cobalto	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,01
Cloreto de Manganês	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,18
Molibdato de Sódio	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,006
Ácido Bórico	H_3BO_3	1
Água destilada autoclavada		1 L
Solução de Vitaminas		
Reagente	Fórmula	Massa (g)
Tiamina HCl		0.1
Biotina		0.0005
Água destilada autoclavada		1 L
Composição do Meio		
Reagente	Fórmula	Medida
Solução Estoque		5 ml
Solução de Silicato		5 ml
Solução de Micronutrientes		5 ml
Solução de Vitaminas		5 ml
Tri (hidroximetil)-amino metano	$\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$	0.575 g
Água destilada autoclavada		5 L

4.2. ENSAIOS DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA

Alíquotas de cada cepa isolada e mantida no Banco de Cultura de Microalgas do LARBIM foram transferidas para balões de 250mL contendo meio de cultura específico para o aumento da densidade celular (otimização) sendo em seguida inoculadas em

balões de 6L contendo 5L de meio de cultura (WC ou Zarrouk), com densidade celular inicial entre 5.10^3 e 10^4cél.mL^{-1} . Os experimentos foram desenvolvidos em sala climatizada a $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ com fotoperíodo de constante 12h e aeração constante fornecida por um mini compressor de membrana RESUN AOC2.

Os experimentos foram acompanhados a cada dois dias, por meio de contagem celular em câmara Sedgewick-Rafter para as células filamentosas e em câmara de Fucks-Rosenthal para as demais e por medidas de fluorescência *in vivo* em fluorômetro Turner Design 10005R para a obtenção das curvas de crescimento, sendo finalizados no início da fase estacionária.

Ao término de cada experimento foi realizado o processo de separação da biomassa algal úmida do meio de cultura por decantação (sedimentação da biomassa devido à gravidade) e/ou por centrifugação em centrífuga refrigerada (NT 825) com temperatura de $21^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, e 3.500 r.p.m., durante 20 minutos. A biomassa úmida obtida foi acondicionada em bandejas de inox e mantida em ultrafreezer (Terroni®) a 30°C para posterior liofilização (Terroni® LD1500). O processo de liofilização se dá pela sublimação da água presente na amostra e consequente extração de toda umidade, restando apenas a biomassa seca. Esta foi pesada em balança analítica e colocada em sacos plásticos herméticos devidamente etiquetados e acondicionados em refrigerador para futuras análises.

4.3. ANÁLISES QUÍMICAS DA BIOMASSA SECA

O perfil de ácidos graxos, realizado no Laboratório de Métodos de Extração e Separação (LAMES/UFG) e os percentuais totais de ácidos graxos em relação à soja foram determinados por cromatografia a gás usando um cromatógrafo Agilent, conforme procedimentos estabelecidos por Menezes *et al.*, (2013). As espécies que apresentaram os maiores percentuais de ácidos graxos em relação à soja e o melhor perfil de ácidos graxos foram selecionadas para avaliar a sua produtividade em diferentes temperaturas.

4.4. ENSAIOS EM DIFERENTES TEMPERATURAS

Para esses experimentos foram escolhidas as cepas D39Z (*Plankthotrix* sp.), D115WC (*Scenedesmus acuminatus*) e D132WC. Para tal, alíquotas de cada cepa foram transferidas para balões de 250mL contendo 150mL de meio de cultura (WC ou

Zarrouk) para aumento da densidade celular, inoculando-as em seguida em balões de 6L contendo 5L de meio de cultura específico nas concentrações iniciais de 5.10^3 a 10^4 cel.mL⁻¹ (Figura 5). Os experimentos foram realizados em duplicata em câmara de germinação (Solab – SL225) em três temperaturas diferentes: 20°C, 25°C e 30°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) com sistema de iluminação fornecido por lâmpadas fluorescentes tipo luz-do-dia, com fotoperíodo de 12h, e aeração constante fornecida por um mini compressor de membrana RESUN.

Os ensaios foram acompanhados a cada dois dias por medidas da fluorescência *in vivo* até a fase estacionária quando os cultivos foram interrompidos. A obtenção da biomassa seca seguiu as condições já descritas no item 4.2.

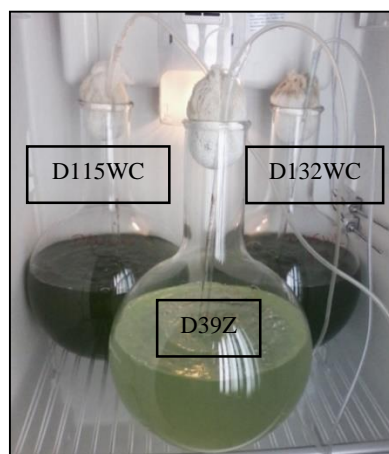


Figura 5. Balões inoculados com as cepas D39Z, D115WC e D132WC utilizadas nos experimentos desenvolvidos na câmara de germinação.

Com a biomassa seca obtida nesses ensaios foram realizadas no LARBIM/UFPB a quantificação dos teores de proteína hidrossolúvel (Derner, 2006), lipídeo total (Bligh & Dyer, 1959), ésteres totais e carboidrato total (Derner, 2006), sempre em duplicatas. Também se analisou os indicativos lipídicos e de carboidratos das três cepas através da técnica de FTIR no Laboratório de Combustíveis e Materiais (LACOM/UFPB). Os espectros de absorção na região de infravermelho foram obtidos em espectrofotômetro modelo IR PRESTIGE-21 por transformada de Fourier (Shimadzu®) na faixa de 4000-400 cm⁻¹. O valor de carboidratos foi obtido a partir da relação da banda 1074 cm⁻¹ com as bandas 1650 cm⁻¹ e 1550 cm⁻¹, já para os lipídeos foram utilizadas as bandas de 2930 cm⁻¹ e 1750 cm⁻¹ sobre as bandas de 1650 cm⁻¹ e 1550 cm⁻¹.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. MICROALGAS ISOLADAS

Um total de 10 espécies de microalgas foram isoladas das amostras coletadas, recebendo os seguintes códigos: D26Z, D33Z, D39Z, D46Z, D90Z, D97Z, D103Z, D115WC, D132WC e D133WC, das quais 7 (D26Z, D33Z, D90Z, D97Z, D115WC, D132WC e D133WC) pertencem ao filo Chlorophyta e 3 (D39Z, D46Z e D103Z) ao filo Cyanophyta (Tabela 4).

A espécie *Synechococcus nidulans* foi isolada de dois locais de coleta: Rio Quinturará pertencente ao município de Frei Martinho (localizado no Seridó paraibano) e Lagoa do Buracão (João Pessoa-PB), sendo assim as cepas D46Z e D103Z são consideradas clones. O mesmo ocorreu com as cepas de *Chlorococcum* sp. (D90Z e D97Z) que foram obtidas da Lagoa do Buracão e do Rio Mumbaba.

Tabela 4. Código no banco de cultura do LARBIM, taxonomia, local de origem, data do isolamento e meio de cultura utilizado das 10 cepas estudadas.

Cepa	Identificação	Procedência	Data do Isolamento	Meio de Cultura
D26Z	<i>Desmodesmus</i> sp.	Açude do Cais, Cuité - PB	09/06/2011	Zarrouk
D33Z	<i>Chlorella</i> cf <i>minutissima</i>	Baía da Traição – PB	07/07/2011	Zarrouk
D39Z	<i>Planktothrix</i> sp.	Açude de Acauã – PB	26/08/2009	Zarrouk
D46Z	<i>Synechococcus nidulans</i>	Rio Quinturará, Frei Martinho - PB	27/07/2011	Zarrouk
D90Z	<i>Chlorococcum</i> sp.1	Lagoa do Buracão – PB	05/01/2012	Zarrouk
D97Z	<i>Chlorococcum</i> sp.2	Rio Mumbaba – PB	28/12/2012	Zarrouk
D103Z	<i>Synechococcus nidulans</i>	Lagoa do Buracão – PB	11/01/2012	Zarrouk
D115WC	<i>Scenedesmus acuminatus</i>	Bebedouro das Ovelhas, Frei Martinho – PB	15/05/2012	WC
D132WC	Clorofícea não ID	Chapada Diamantina, Vale do Capão, Cachoeira da Purificação – BA	30/05/2012	WC
D133WC	<i>Lagerheimia longiseta</i>	Açude Malhada Limpa - RN	15/05/2012	WC

5.2. DESCRIÇÕES DAS CEPAS

5.2.1. CLOROFÍCEAS


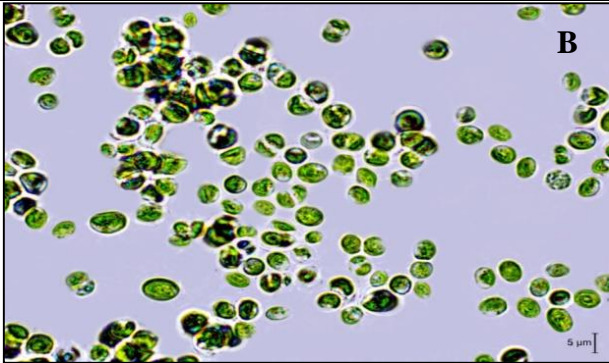
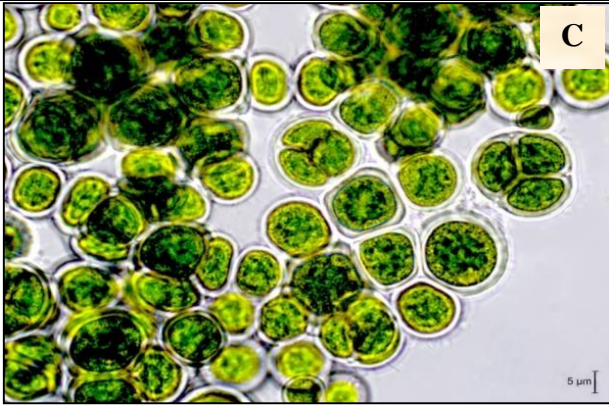
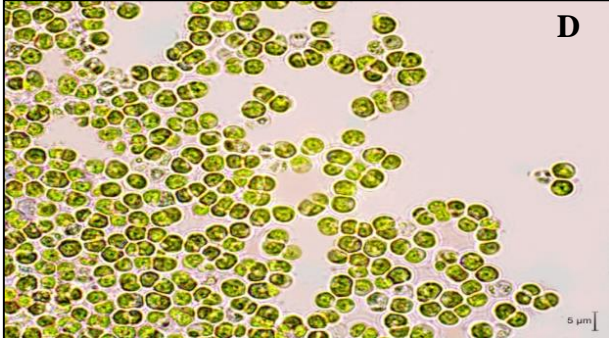
Imagem em microscópio ótico	Descrição da cepa
	D26Z - <i>Desmodesmus</i> cf. <i>costato-granulatus</i> : células isoladas ou em pares, dispostas linearmente, livre-flutuantes. As células são oblongas ou ovóides, e possuem cloroplasto parietal com único pirenoide. Apresenta em suas extremidades espinhos curtos, porém nem sempre visíveis.
	D33Z – <i>Chlorella</i> cf. <i>minutissima</i> : células solitárias, esféricas, ovóides ou elipsoides, com parede distinta e delgada, contendo único núcleo, de vida livre.
	D90Z - <i>Chlorococcum</i> sp.1: células de vida livre, esféricas, com parede distinta e espessa. A cepa estudada apresentou formas não esféricas comumente formando agregados.
	D97Z – <i>Chlorococcum</i> sp.2: células de vida livre, esféricas, com parede distinta e delgada. A cepa estudada apresentou células com formato irregular em pares comumente formando agregados.

Figura 6. Fotografia em microscópio ótico das cepas, aumento de 1000x. **A.** D26Z, *Desmodesmus* cf. *costato-granulatus*; **B.** D33Z, *Chlorella* cf. *minutissima*; **C.** D90Z, *Chlorococcum* sp.1; **D.** D97Z, *Chlorococcum* sp.2.


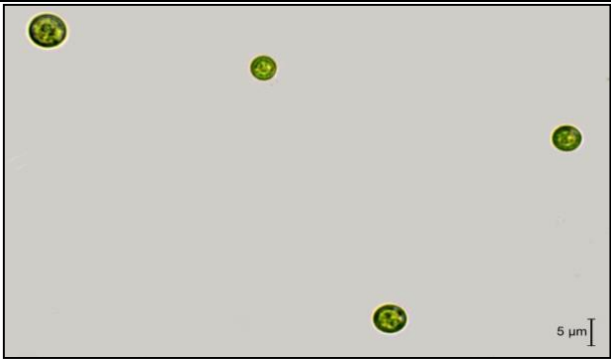
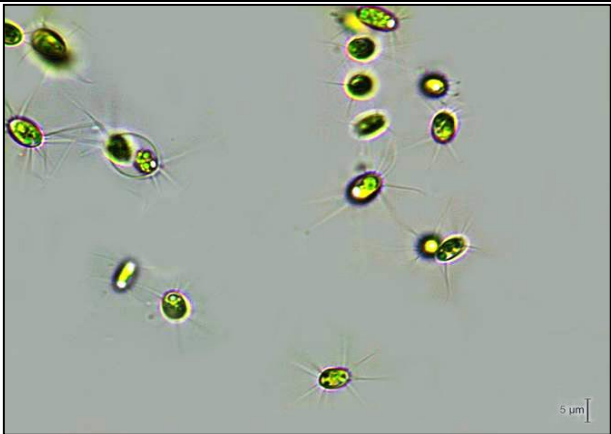
Imagem em microscópio ótico	Descrição da cepa
	D115WC - <i>Scenedesmus acuminatus</i> : cenóbios planos, livre-flutuantes formados por duas ou quatro células dispostas paralelamente unidas pelo eixo mais longo, formando uma série linear. Células internas fusiformes e células externas semi-curvadas ou lunadas, com extremidades afiladas. Frequentemente com vacúolos distribuídos por todo conteúdo celular.
	D132WC – Clorofícea não identificada: células isoladas, esféricas, de vida livre, medindo aproximadamente 5µm de diâmetro.
	D133WC - <i>Lagerheimia longiseta</i> : indivíduos unicelulares de vida livre, com formas que variam entre esférica, elipsoide e ovóide, com 4-6 espinhos em ambos os polos, que são levemente atenuados. Os espinhos são longos, levemente flexuosos e afilam em direção ao ápice.

Figura 7. Fotografia em microscópio ótico das cepas, aumento de 1000x. **A.** D115WC, *Scenedesmus acuminatus*; **B.** D132WC, Clorofícea não identificada; **C.** D133WC, *Lagerheimia longiseta*.

5.2.2. CIANOBACTÉRIAS

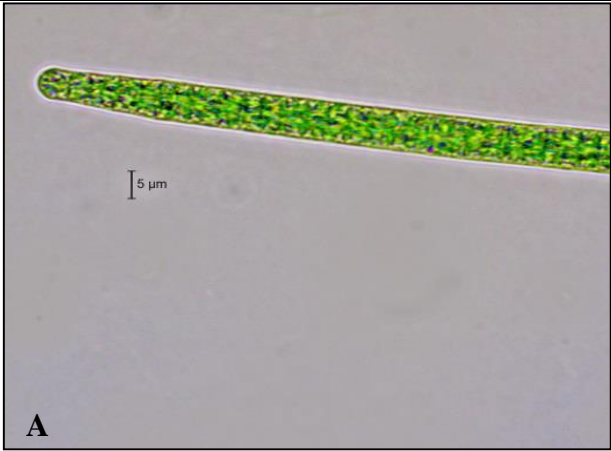
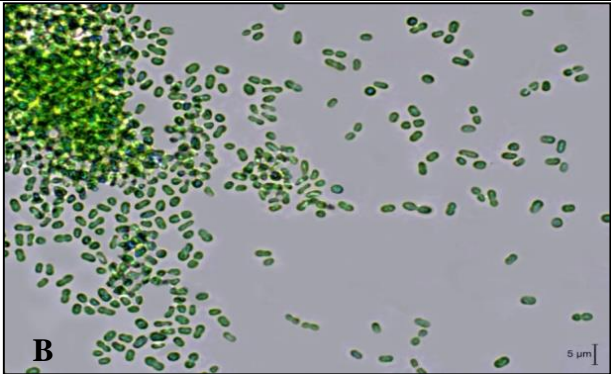

Imagem em microscópio ótico	Descrição da cepa
 <p>A</p>	<p>D39Z – <i>Planktothrix</i> sp.: filamentos solitários, livre-flutuantes, retos ou levemente ondulados, sem bainha mucilaginosa e com movimento deslizante. Células mais curtas que largas, quadráticas ou subquadráticas, com célula apical arredondada, sem caliptra. Aerótopos distribuídos por todo conteúdo celular. Reprodução assexuada por formação de hormogônios imóveis, com auxílio de necrídios.</p>
 <p>B</p>	<p>D46Z - <i>Synechococcus nidulans</i>: células cilíndricas ou ovais, solitárias, imóveis, de coloração verde-azulada, sem mucilagem, com conteúdo celular homogêneo e sem aerótopos. Divisão celular ocorre por fissão binária em único plano perpendicular ao eixo longitudinal.</p>
 <p>C</p>	<p>D103Z – <i>Synechococcus nidulans</i>: células cilíndricas ou ovais, solitárias, imóveis, de coloração verde-azulada, sem mucilagem, com conteúdo celular homogêneo e sem aerótopos. Divisão celular ocorre por fissão binária em único plano perpendicular ao eixo longitudinal.</p>

Figura 8. Fotografia em microscópio ótico das cepas, aumento de 1000x. **A.** D39Z – *Planktothrix* sp.; **B.** D46Z - *Synechococcus nidulans*; **C.** D103Z – *Synechococcus nidulans*.

5.3. DADOS DE CULTIVO

Na tabela 5 estão demonstrados os dados de tempo de cultivo, velocidade de crescimento (k), duração da fase *log* e rendimento final em biomassa seca. Os cultivos

duraram em média 19,5 dias, com menor tempo apresentado pela cepa D39Z (11 dias) e maior tempo encontrado na cepa D90Z com total de 33 dias de cultivo.

As cepas apresentaram rendimento em biomassa variável, sendo a maioria superior à 0,5 g.L⁻¹. Os maiores valores foram obtidos para as cepas D90Z, D33Z, D97Z e D39Z, com 1,054 g.L⁻¹, 0,992 g.L⁻¹, 0,680 g.L⁻¹ e 0,630 g.L⁻¹, respectivamente. Já o menor rendimento (0,170 g.L⁻¹) foi apresentado pela cepa D133WC.

A cepa D39Z apresentou a menor duração do cultivo, com apenas 11 dias e rendimento final de biomassa seca de 0,630 g.L⁻¹, mostrando-se interessante para os cultivos em diferentes temperaturas, objetivando a melhoria destes valores.

Tabela 5. Dados de cultivo das 10 cepas estudadas apresentando: duração do cultivo em dias, velocidade de crescimento na fase log (k), duração da fase exponencial de crescimento em dias e total de biomassa seca produzida (g.L⁻¹).

Cepa	Tempo de cultivo (dias)	k (fase log)	Duração da fase log (dias)	Biomassa seca (g.L ⁻¹)
D26Z	18	0,26 ± 0,06	4	0,528
D33Z	12	0,27 ± 0,04	3	0,992
D39Z	11	0,30 ± 0,09	5	0,630
D46Z	22	0,72 ± 0,48	4	0,380
D90Z	33	1,14 ± 0,47	4	1,054
D97Z	16	0,56 ± 0,13	4	0,680
D103Z	17	0,87, ± 0,05	3	0,518
D115WC	13	0,69 ± 0,24	4	0,386
D132WC	27	0,79 ± 0,24	4	0,536
D133WC	26	0,66 ± 0,15	8	0,170

5.4. TEOR DE ÉSTERES METÍLICOS DE ÁCIDOS GRAXOS

O teor de ésteres totais das microalgas estudadas está evidenciado na figura 9, onde percebemos que três das cepas testadas apresentaram valores superiores ao encontrado para a soja. Destacando-se as cepas D115WC e D132WC, que produziram 211% e 201%, respectivamente, a mais que a soja, sendo consideradas cepas promissoras para produção de biodiesel. As cepas D115WC (415,7 mg g⁻¹) e D132WC (397,1mg.g⁻¹) apresentaram valores de ésteres superiores a todas as cepas testadas por Menezes *et al.* (2013), exceto para a cepa de *Choricystis* sp. (A), que apresentou teor de 422, 9 mg.g⁻¹.

Ressalta-se que o rendimento em ésteres da cepa de *Synechococcus nidulans* (D103Z) foi aproximadamente 100% maior do que seu clone (D46Z), sugerindo que cepas da mesma espécie provenientes de ambientes diferentes podem possuir composição química diferente, devido suas diferenças genéticas. O mesmo ocorreu com a cepa D97Z (*Chlorococcum* sp.1) que apresentou teor de éster quase 10 vezes maior que seu clone D90Z (*Chlorococcum* sp.2).

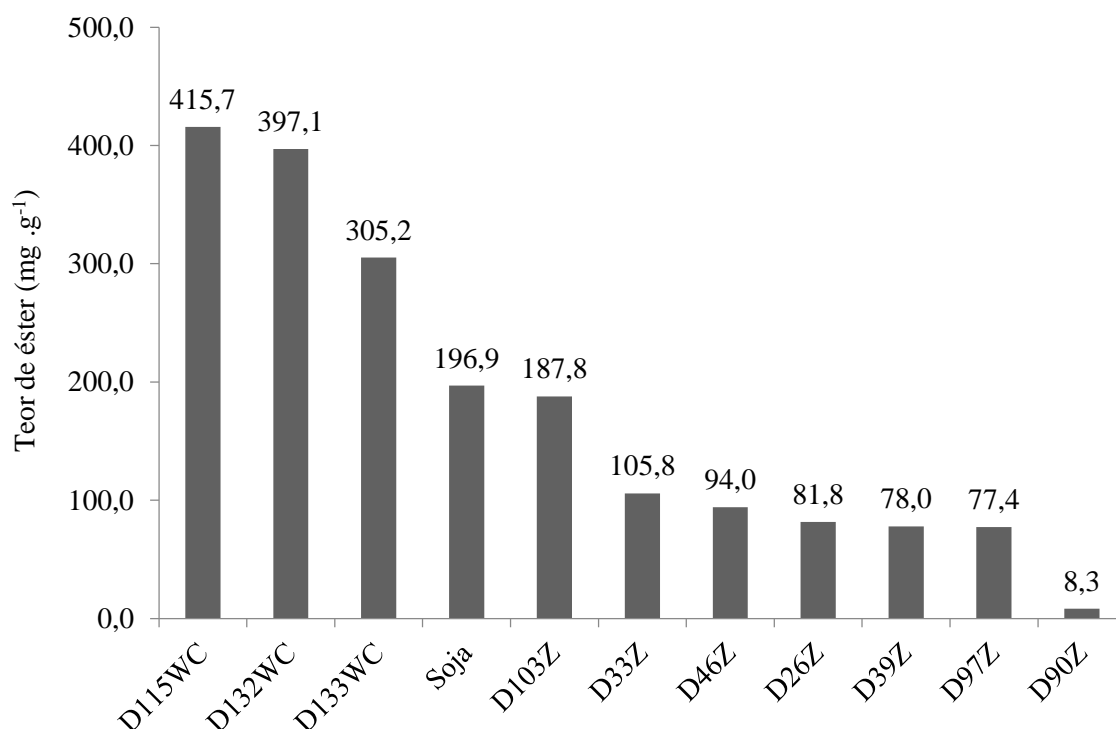


Figura 9. Teor de ésteres totais (mg de éster/g de biomassa seca) apresentado pelas 10 cepas estudadas em comparação com a soja.

A tabela 6 apresenta a diversidade e quantidade dos ácidos graxos produzidos pelas 10 microalgas estudadas em comparação com a soja. A diversidade de ácidos graxos encontrada nas microalgas foi superior a da soja (6 tipos) e variou entre 7 (D39Z) e 16 (D133WC), ressaltando-se que apenas as cepas D39Z e D90Z apresentaram diversidade de ácidos graxos inferior a 10.

Todas as microalgas apresentaram teores de ácidos graxos palmítico, esteárico, palmitoléico, linolênico, oleico e linoleico, exceto para cepa D90Z. Os ácidos palmítico e linolênico foram os encontrados em maiores concentrações na maioria das microalgas estudadas, exceto para a cepa D46Z que apresentou maior teor do ácido palmitoléico (40,4%) e para cepa D90Z que apresentou 23% do ácido esteárico (Tabela 6).

Sabendo-se que o ácido palmítico pode ser utilizado como ingrediente surfactante de detergentes, sabões, produtos de limpeza e também em cosméticos por diversas propriedades que apresenta (Acme-Hardesty, 2014a) e que sua principal fonte é a palma (*Opuntia* sp.) que produz cerca de 42,7% (Zambiasi *et al.*, 2007), a cepa D133WC se destaca, já que produziu 47,7%, enquanto que todas as outras cepas de microalgas testadas apresentaram teores de ácido palmítico inferiores a 8%. Este valor é superior ao encontrado por Menezes *et al.* (2013), que obteve maior valor de ácido palmítico na cepa de *Choricystis* sp. (B), com 37,1%, e por Viêgas (2010), que testando diferentes métodos de extração lipídica na cepa de *Chlorella pyrenodoisa* obteve maior teor de ácido palmítico de 24,89% utilizando o método de ultrassom com solvente extrator clorofórmio:metanol (2:1).

O maior valor encontrado para o ácido esteárico nas cepas estudadas foi de 23% (D90Z – *Chlorococcum* sp. 1), valor superior aos encontrados para as cepas de *C. minutissima* e *C. vulgaris* em todas as condições testadas no trabalho de Costa *et al.* (2006), porém inferior ao obtido pelas cepas de *C. aponinum* e *Phormidium* sp. estudadas por Karatay & Dönmez (2011), com valores de 29.4% e 47.6%, respectivamente. A principal utilização do ácido esteárico é na fabricação de sabões, detergentes e xampus, que pode ser utilizado como base do produto, ou como surfactante, emulsificante, estabilizador, espessante ou endurecedor (Acme-Hardesty, 2014b).

O ácido palmitoléico, ácido graxo essencial ômega-7, é principalmente utilizado na indústria farmacêutica e cosmética, podendo ser encontrado na noz macadâmia, peixes de água fria e em frutos do espinheiro marítimo, arbusto do gênero *Hippophae*, (Ercisli *et al.*, 2008). O maior teor encontrado nas cepas estudadas foi de 40,4% para a cianobactéria D46Z, valor este aproximadamente 400% maior que o encontrado para seu clone (D103Z), que apresentou teor de 7,6% de ácido palmitoléico. Menezes *et al.* (2013) estudando cinco microalgas dulcícolas relatou valores inferiores ao encontrado neste trabalho para este ácido, não ultrapassando 2,5%, já Costa *et al.* (2006) obtiveram teor de 82,63% deste ácido quando cultivaram a cepa *C. minutissima* em condições otimizadas (35°C, 2500 lux, fonte de carbono NaHCO₃ e concentração de NO₃ de 1,0g.L⁻¹).

Tabela 6. Diversidade e teor (%) de ésteres metílicos dos ácidos graxos das 10 cepas estudadas em comparação com a soja. NI- ácido graxo não identificado.

FAME	Soja	D26Z	D33Z	D39Z	D46Z	D90Z	D97Z	D103Z	D115WC	D132WC	D133WC
Láurico	—	—	—	—	—	—	0,2	0,4	0,3	0,8	0,6
Mirístico	—	—	1	—	19,2	—	1,9	0,6	0,5	1	1,8
Palmitico	12,2	16,9	18,7	34,5	17,3	18,6	17,5	17,5	28,6	29,1	47,7
Margárico	—	—	—	—	—	2,8	0,5	—	—	—	—
Esteárico	3,9	0,6	1	1,9	1,6	23	1,1	0,6	6,5	5	3,7
NI	—	—	5,4	—	—	—	—	—	—	—	—
Miristoléico	—	—	—	—	5	—	0,6	0,4	0,3	0,2	1,7
9-Pentadecenóico	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,2
Palmitoléico	0,1	4,8	3,9	6	40,4	5,9	2,6	7,6	2,1	6,2	4,6
<i>c9</i> Heptadecaenoico	—	—	—	—	—	5,8	1,7	0,4	4,6	5,6	1,6
Vacênico	—	1,6	1,4	—	4	—	0,1	1	—	—	3
Oléico	22,1	10,6	5,4	7,7	3,7	—	3,6	5,1	28,1	20,1	17,4
NI	—	—	0,5	—	—	—	—	—	—	—	—
NI	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,6	—
7,10 – Hexadecadienóico	—	4,4	4,1	—	—	3,4	8,2	11	2,1	1,5	4,1
Linoléico	54,1	18,4	16,1	30,1	6,7	—	15,1	19,3	11,2	6,5	4,5
γ -Linolênico	—	0,8	—	18,1	—	13,9	—	—	0,2	8,8	—
7,10,13 – Hexadecatrienóico	—	—	10,3	—	1	4,6	17,1	14,4	2,3	1,3	1,1
Linolênico	7,6	26,5	30,8	1,7	1,1	22	29,8	21,7	12,2	3,8	5,9
<i>c6,c9,c12,c15</i> Octadecatetraenóico	—	2,5	1,4	—	—	—	—	—	1	9,5	0,5
Araquidônico	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,6
NI	—	12,9	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Diversidade total de FAME	6	11	13	7	10	9	14	13	14	15	16

O ácido graxo tri-insaturado linolênico (ω -3) apresentou valores que variaram de 1,1% (D46Z) a 30,8% (D33Z) nas microalgas testadas. Avaliando várias metodologias de extração lipídica com *Chlorella pyrenodoisa*, Viêgas (2010) obteve valores superiores ao encontrado neste estudo (máx. 42,47%), exceto para o tratamento com ultrassom e clorofórmio:metanol (2:1) que apresentou teor de ácido linolênico de 29,04%, inferior ao obtido para a cepa D33Z (*Chlorella cf minutissima*).

Apesar de não haver restrições na regulamentação nacional sobre teores adequados de ácidos graxos na biomassa indicada para produção de biodiesel, a norma internacional EN14214 estipula que o limite máximo aceitável para o teor de ácido linolênico é de 12%, e de 1% para ácidos graxos com mais de três duplas ligações (PUFA). Utilizando estes parâmetros, apenas as cepas D39Z, D46Z, D115WC e D133WC se mostraram indicadas à produção de biodiesel, com a D115WC ultrapassando apenas 0,2 do limite permitido para o ácido linolênico e a D133WC com 0,1% a mais de PUFA.

Richmond (2004) relata que a deficiência de ácidos graxos essenciais, principalmente ômega-3, afeta negativamente a taxa de fecundidade, fertilização e consequentemente de filhotes de peixes marinhos. Assim é de extrema importância uma dieta rica nestes ácidos graxos no cultivo de peixes, destacando o uso das microalgas na aquicultura.

Ainda na tabela 6 é percebido que metade das microalgas estudadas apresentou teores do ácido graxo essencial γ -linolênico (ω -6/GLA), contudo apenas as cepas D39Z (18,1%) e D90Z (13,9%) apresentaram teores superiores a 10%. Este ácido graxo ω -6 pode ser utilizado como suplemento alimentar e para o enriquecimento de fórmulas infantis, já que possui funções importantes no desenvolvimento (Spolaore *et al.*, 2006). A cepa D39Z (*Planktothrix* sp.) apresentou percentual bastante superior ao encontrado para as microalgas dulcícolas testadas por Menezes *et al.* (2013), assim como quando comparada com 28 microalgas marinhas testadas por Viso & Marty (1993) que conseguiram maior valor, apenas 4%, de GLA para a cianobactéria *A. quadruplicatum*. Já Li e colaboradores (2011) obtiveram percentual semelhante à cepa D39Z, quando cultivaram a cepa de *Chlorella* sp. 10b em concentrado puro de água residual, com valor de 18,79% de GLA.

Na figura 10 estão representados os valores totais (%) de ácidos graxos saturados (SFA), monosaturados (MUFA), diinsaturados (DUFA), triinsaturados (TUFA) e poliinsaturados (PUFA) das cepas de clorofíceas e cianobactérias estudadas em

comparação com a soja. Pode-se perceber que todas as cepas apresentaram teores de SFA superiores aos da soja, com destaque para a cepa D133WC que apresentou total de 53,8%, valor este superior aos obtidos por Menezes *et al.* (2013) e Li *et al.* (2011).

Já os valores de MUFA foram inferiores aos da soja para a maioria das cepas estudadas, contudo as cepas D46Z, D115WC e D132WC apresentaram valores superiores, com 53,1%, 35,1% e 32,7%.

Ainda na figura 10 pode-se notar que metade das cepas estudadas apresentaram teores de PUFA, vale salientar que todas pertencentes ao grupo das clorofíceas. Destas, pode-se destacar as cepas D26Z e D132WC, com totais de 15,4% e 9,5%, respectivamente. A cepa D132WC apresentou resultado semelhante ao encontrado por Menezes *et al.* (2013) para a cepa *Choricystis sp.* (B), com 9,6% de PUFA.

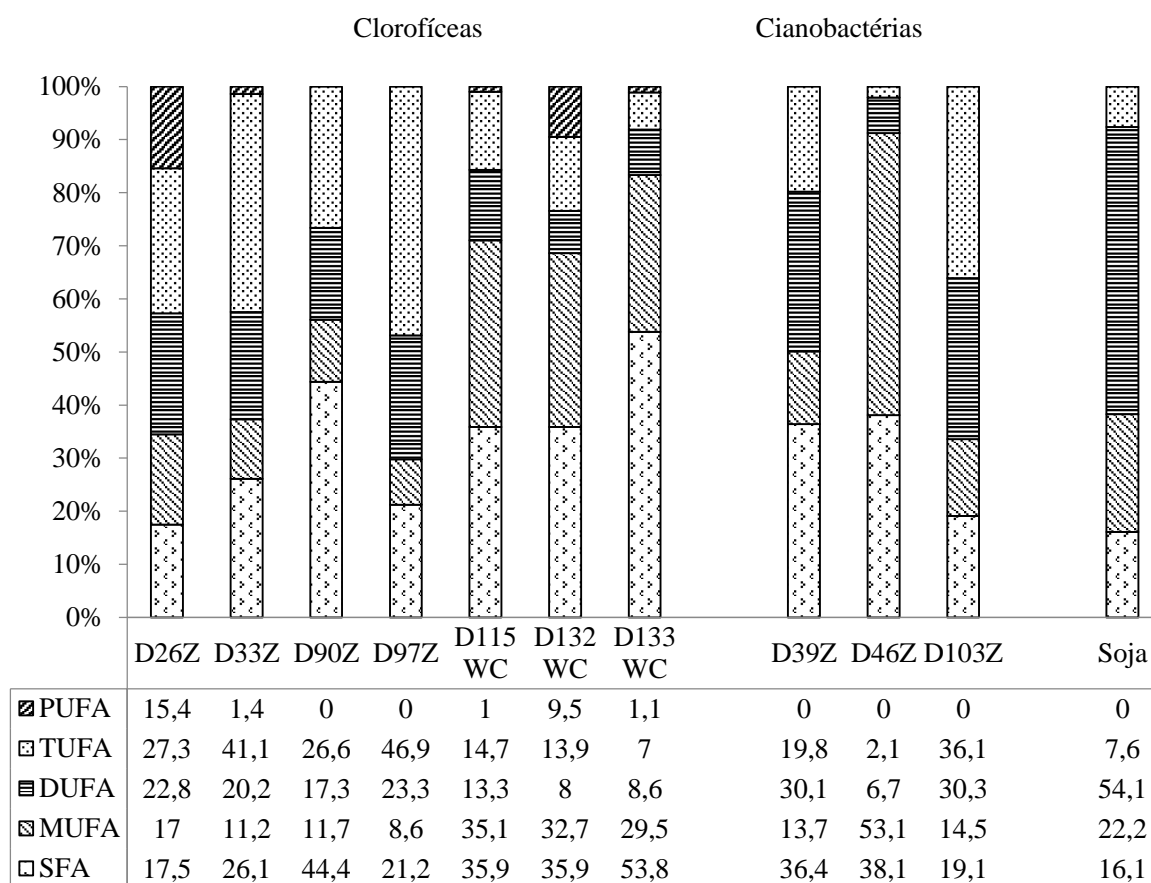


Figura 10. Comparação dos percentuais totais de ácidos graxos das cepas de clorofíceas e cianobactérias estudadas em comparação com a soja, onde SFA: saturados, MUFA: monosaturados, DUFA: diinsaturados, TUFA: triinsaturados e PUFA: polinsaturados.

5.5. CULTIVO DAS CEPAS SELECIONADAS EM DIFERENTES TEMPERATURAS

Os dados dos cultivos das cepas em diferentes temperaturas estão representados na tabela 7. O maior valor de k (fase *log*) obtido foi de $1,12 \pm 0,39$ para a D132WC no cultivo a 20°C, já o menor valor exibido foi para a D39Z ($0,58 \pm 0,17$) no cultivo controle (25°C).

As cepas D39Z e D115WC apresentaram suas mais elevadas taxas de duplicação nos cultivos a 30°C, com $0,75 \pm 0,18$ e $0,92 \pm 0,26$, respectivamente. Resultado este semelhante ao encontrado por Hanagata *et al.* (1992) que obtiveram maior taxa de crescimento para cepas de *Scenedesmus* sp. e *Chlorella* sp. também nos cultivos a 30°C em comparação com os de 25°C; e por Latala (1991) que demonstrou em experimentos com nove microalgas em diferentes temperaturas (5 a $38 \pm 1^\circ\text{C}$), que a maioria delas, incluindo uma cepa de *Scenedesmus acuminatus* (LA-7/586), cresce melhor em temperaturas entre 26-30°C.

Tabela 7. Dados de taxa de duplicação (média $k \pm$ desvio-padrão), duração da fase exponencial (*log*), tempo de cultivo, rendimento final de biomassa seca e quantificação de éster (mg éster/g biomassa) das cepas D39Z, D115WC e D132WC cultivadas em três temperaturas.

Cepa	Temperatura (°C)	k (fase <i>log</i>)	Duração da fase <i>log</i> (dias)	Tempo de cultivo (dias)	Biomassa seca (g.L ⁻¹)	Ésteres (mg éster/g biomassa)
D39Z	20	$0,73 \pm 0,21$	5	24	0,306	249,64
	25	$0,58 \pm 0,17$	5	18	0,458	255,18
	30	$0,75 \pm 0,18$	4	13	1,020	234,44
D115WC	20	$0,85 \pm 0,06$	3	17	0,186	244,64
	25	$0,75 \pm 0,29$	4	18	0,264	270,82
	30	$0,92 \pm 0,26$	4	13	0,329	534,44
D132WC	20	$1,12 \pm 0,39$	5	17	0,232	289,55
	25	$0,85 \pm 0,07$	3	18	0,364	275,34
	30	$0,74 \pm 0,14$	3	13	0,522	246,13

Observou-se que a duração da fase exponencial (*log*) variou em geral entre três e cinco dias. O cultivo com maior tempo de duração foi com a D39Z cultivada a 20°C, com total de 24 dias, entretanto quando cultivadas a 30°C todas as cepas apresentaram encurtamento do tempo de cultivo, com 13 dias no total.

Ainda na tabela 7, podemos perceber que as três cepas cresceram seu rendimento final de biomassa seca à medida que aumentou a temperatura. O maior valor foi de $1,020\text{g.L}^{-1}$, para a cepa D39Z cultivada a 30°C , já as cepas D115WC e D132WC produziram rendimentos de $0,329\text{g.L}^{-1}$ e $0,522\text{g.L}^{-1}$, respectivamente, também nesta temperatura. Em equivalência, os menores rendimentos de biomassa para cada cepa foram obtidos nos cultivos a 20°C , com valores de $0,306\text{g.L}^{-1}$, $0,186\text{g.L}^{-1}$ e $0,232\text{g.L}^{-1}$, para D39Z, D115WC e D132WC, respectivamente.

O resultado da cepa D39Z (*Planktothrix* sp.) se assemelhou ao encontrado para a *Spirulina major* por Karam & Soccol (2007) que também obtiveram menor rendimento de biomassa no cultivo a 20°C , com $0,735\text{g.L}^{-1}$ e maior ($1,172\text{g.L}^{-1}$) quando cultivaram a cianobactéria à 30°C , sendo considerada a temperatura ótima de crescimento para a cepa estudada. Já Gomes (2011) encontrou resultados contrários com a cepa de *P. agardhii* cultivada em diferentes temperaturas, que variaram de 18°C a 30°C (fotoperíodo: 18:6h), pois a cepa apresentou maior rendimento em biomassa no cultivo a 21°C e menor a 30°C , com valores de $124,01\text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$ e $45,52\text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente.

Tripathi e colaboradores (2015) também obtiveram maior produtividade de biomassa nos cultivos a 30°C , em comparação com temperaturas inferiores, para a cepa ISTGA1 de *Scenedesmus* sp., porém com valor inferior ($86,1\pm 0,31\text{mg.L}^{-1}$) ao encontrado para a cepa de *Scenedesmus acuminatus* (D115WC).

O teor de ésteres variou diferentemente para cada cepa. O maior valor ($534,44\text{mg.g}^{-1}$) foi obtido no cultivo a 30°C com a cepa D115WC. Já a cepa D39Z apresentou o maior conteúdo de ésteres no cultivo controle (25°C), com $255,18\text{mg.g}^{-1}$, enquanto que a D132WC aumentou seu teor de éster no cultivo a 20°C (Tabela 7).

O maior conteúdo proteico obtido entre as cepas estudadas foi de $62,10 \pm 2,08$ para a cepa D39Z no cultivo controle (25°C). As cepas D115WC e D132WC apresentaram seus maiores teores proteicos quando cultivadas a 20°C , com $50,91\pm 0,36$ e $50,87\pm 0,45$ (Figura 11).

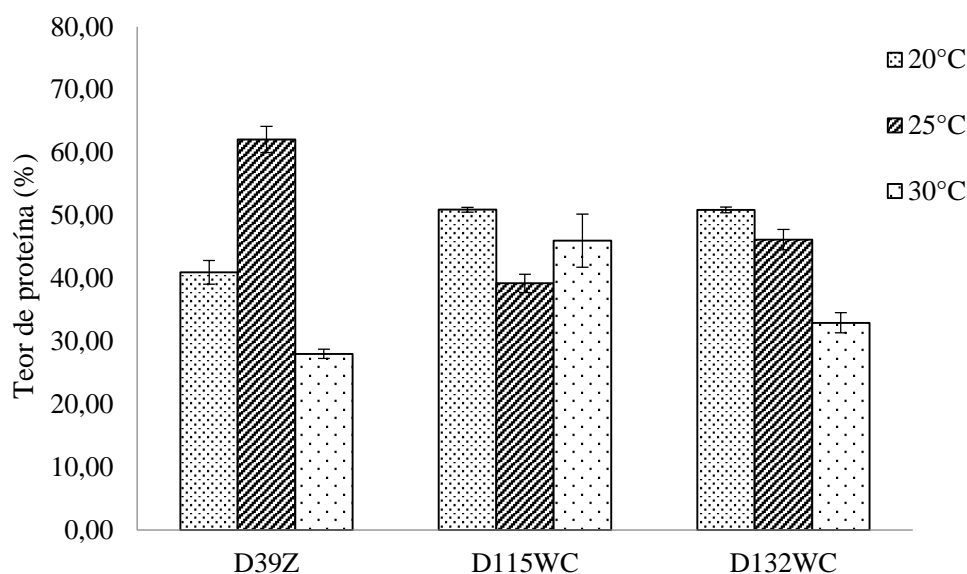


Figura 11. Comparação da média geral dos percentuais de proteínas hidrossolúveis das cepas cultivadas em diferentes temperaturas.

Becker (2007) relata que *Scenedesmus obliquus* produz cerca de 50% de proteína, sendo este valor semelhante ao encontrado para a cepa D115WC (*S. acuminatus*) a 20°C, e que *Arthrospira maxima* pode alcançar valores de até 71% de conteúdo proteico, sendo este superior ao melhor resultado aqui obtido, com a cepa D39Z (*Planktothrix* sp.).

A cepa D132WC respondeu de forma decrescente, quanto ao teor proteico, ao aumento da temperatura, semelhante ao encontrado para as cepas de *Isochrysis galbana*-D, e *I. galbana*-N, isoladas da Dinamarca e da Grécia, respectivamente (Sayegh & Montagnes, 2011).

Na figura 12 estão expostos os teores de carboidratos obtidos para as cepas cultivadas em diferentes temperaturas. Percebe-se que os maiores teores de carboidratos foram encontrados para a cepa D115WC nos cultivos a 20°C e 30°C, com valores de $30,19 \pm 2,29$ e $24,86 \pm 1,31$, respectivamente. Já a cepa D39Z a 25°C apresentou a menor percentual de carboidratos no geral com $12,72 \pm 1,23$.

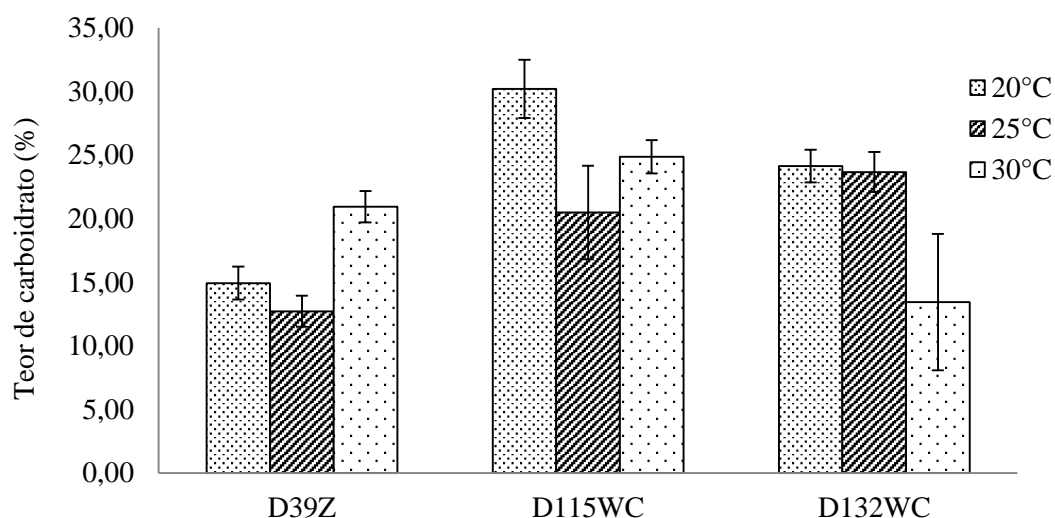


Figura 12. Comparação da média geral dos percentuais de carboidratos obtidos nos cultivos das cepas D39Z, D115WC e D132WC em temperaturas diferentes.

O etanol pode ser produzido a partir da fermentação de biomassa de diversos organismos, dentre eles as microalgas (Schmitz *et al.*, 2012). A cepa D115WC mostrou-se promissora para produção de bioetanol, por apresentar boa taxa de carboidratos em sua biomassa quando cultivada a 20°C. Já foi demonstrado que microalgas como *Chlorococcum littorale* e dos gêneros *Chlorella* e *Chlamydomonas* podem ser utilizadas para este fim (Ueno *et al.*, 1998). Os carboidratos ainda possuem diversas aplicações, como adoçantes naturais, solventes e compostos químicos úteis para a indústria de química fina, como ácido cítrico, aspártico e glutâmico, devido à conversão de sacarose e D-glicose em escala industrial (Ferreira *et al.*, 2013).

Os maiores valores lipídicos foram obtidos nos cultivos a 20°C, com teores de $34,64 \pm 2,21$ e $24,78 \pm 3,47$ para as cepas D39Z e D132WC, respectivamente. Já a cepa D115WC apresentou maior porcentagem lipídica a 25°C, com $7,88 \pm 0,88$ (Figura 13). Em contrapartida todas as cepas apresentaram seus menores teores lipídicos nos cultivos a 30°C, com valores de $13,77 \pm 2,03$, $3,04 \pm 0,31$ e $9,43 \pm 0,24$, para as cepas D39Z, D115WC e D132WC, respectivamente.

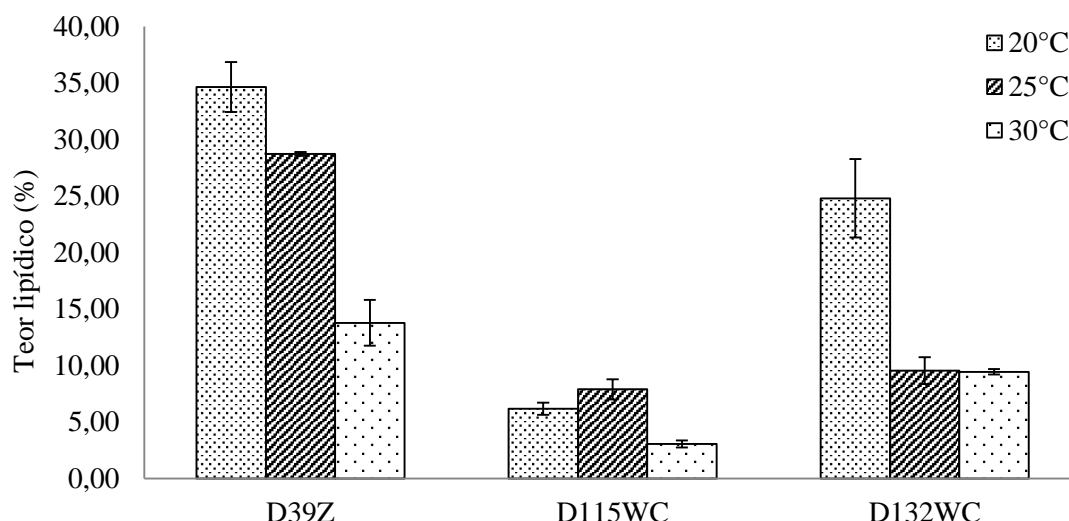


Figura 13. Teores lipídicos (%) encontrados para as cepas D39Z, D115WC e D132WC cultivadas em três temperaturas diferentes.

Quando Xin, e colaboradores (2011) cultivaram a cepa de *Scenedesmus* sp. LX1 em temperaturas que variaram de 10-30°C obtiveram melhores resultados de teor lipídico (~35%) nos cultivos a 20°C e consideraram esta temperatura ótima para seu crescimento, diferentemente do resultado encontrado para a cepa de *S. acuminatus* estudada (D115WC) que apresentou maior teor no cultivo a 25°C. O maior valor obtido para a cepa D115WC foi inferior a todas as cepas de *S. obliquus* estudadas por Abou-Shanab *et al.* (2011), com a cepa YSR01 atingindo 58% de conteúdo lipídico; assim como para a cepa de *Scenedesmus* sp. clone MJ13 analisada por Pepino (2011), que obteve 25,14% de lipídeos neutros.

Os espectros de IV obtidos pela metodologia de FTIR da cepa D39Z em diferentes temperaturas estão representados na figura 14. Pode-se perceber a presença de todas as bandas características de microalgas, com picos bem definidos de Amida I e II assim como as bandas de C-H de ácidos graxos, a 2930 cm⁻¹ e a banda característica de lipídeo a 1750 cm⁻¹ pouco evidente nos espectros da cepa D39Z, em destaque.

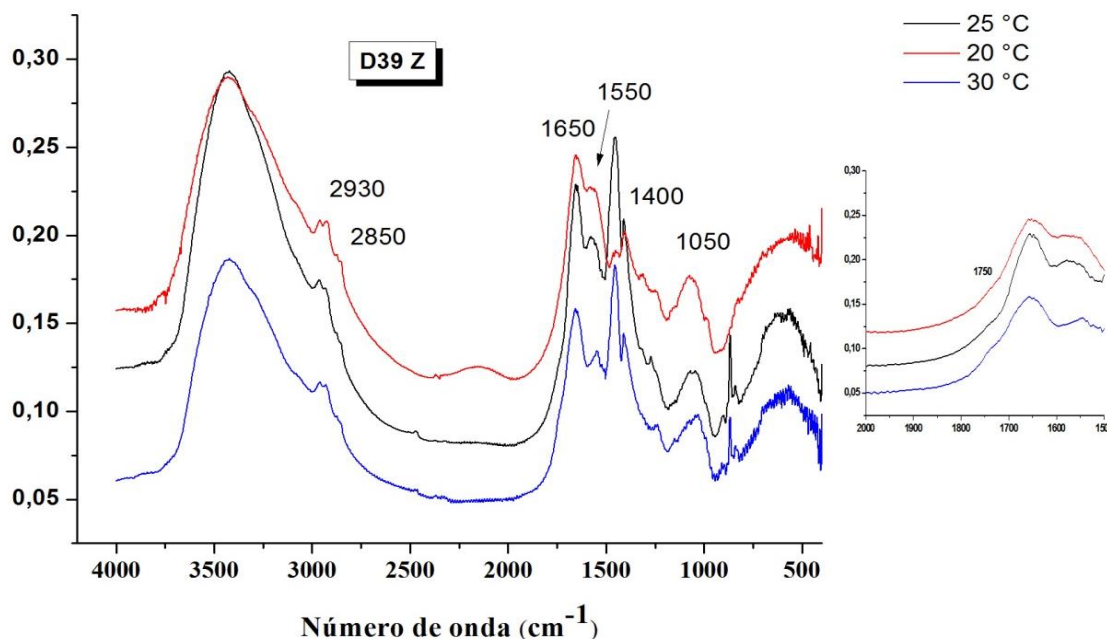


Figura 14. Espectros de absorvância de IV da cepa D39Z cultivada em diferentes temperaturas.

As razões entre bandas de carboidrato e lipídeos e as bandas de amida I e II da cepa D39Z em diferentes temperaturas estão demonstrados na figura 15. As razões utilizando a banda de amida II apresentaram valores superiores aos obtidos com a banda de amida I em todas as temperaturas testadas, porém com valores proporcionais. Assim, entende-se que as duas bandas de amida podem ser utilizadas como normalização das bandas de lipídeo e carboidrato testadas.

A maior razão obtida para a banda de 1074 cm^{-1} foi na temperatura de 20°C , com valores de 0,70 (carbo/amida I) e 0,77 (carbo/amida II). Pode-se notar que houve um decréscimo das razões a 25°C e elevação a 30°C , independentemente da banda de amida utilizada, esta variação também foi percebida nos resultados obtidos pela metodologia tradicional, porém esta apresentou maiores teores de carboidrato a 30°C para a cepa D39Z.

As duas bandas de lipídeo utilizadas (2930 cm^{-1} e 1750 cm^{-1}) demonstraram, em geral, resultados similares independentemente da banda de amida, com os maiores valores na temperatura de 20°C . Apenas as razões obtidas pela banda $2930/\text{amida I}$ apresentou uma queda gradual em resposta ao aumento da temperatura, com maior razão de 0,83 e menor de 0,72, semelhante ao encontrado pela metodologia gravimétrica

de Bligh & Dyer (1959). As outras relações mostraram uma queda dos valores lipídicos nos cultivos a 25°C e aumento a 30°C.

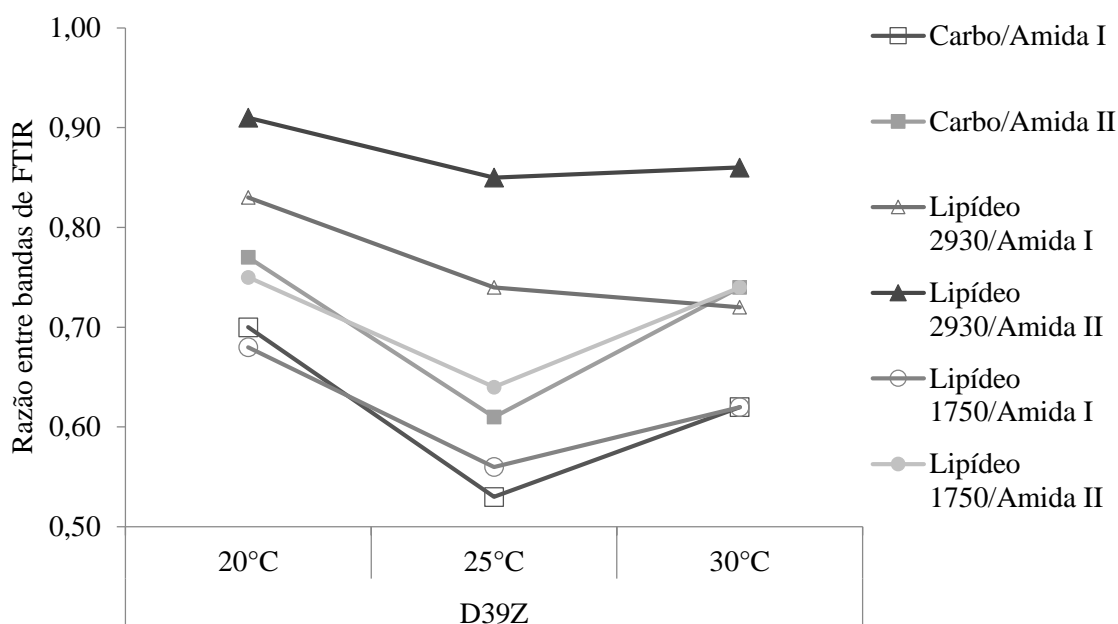


Figura 15. Razões obtidas entre as bandas de carboidrato e lipídeos e as bandas de amida I e amida II para a cepa D39Z nos cultivos em diferentes temperaturas.

Os espectros de IV obtidos pela metodologia de FTIR da cepa D115WC em diferentes temperaturas estão representados na figura 16. Pode-se perceber a presença de todas as bandas características de microalgas, com picos bem definidos de amida I e II assim como as bandas de C-H de ácidos graxos, a 2930 cm^{-1} e a banda característica de lipídeo a 1750 cm^{-1} foi mais evidente nos espectros a 20°C e 30°C, em destaque.

As razões utilizando a banda de amida II apresentaram valores superiores aos obtidos com a banda de amida I em todas as temperaturas testadas, porém com valores proporcionais (figura 17). As maiores razões para carboidrato foram obtidas no cultivo a 25°C, com valores de 0,83 (carbo/amida I) e 1,01 (carbo/amida II) e as menores no cultivo a 20°C, resultado diferente do obtido pela metodologia tradicional, que apontou maiores teores de carboidrato na temperatura mais baixa.

Ainda na figura 17 percebe-se que as bandas de lipídeos utilizadas sugerem maiores teores nos cultivos a 25°C, com maior razão de 0,77 (2930/amida II), confirmando os valores obtidos pela metodologia tradicional empregada. Todas as bandas utilizadas apontaram menores teores de lipídeos para a cepa D115WC nos

cultivos a 20°C, já pelo método de Bligh & Dyer (1959) o menor teor encontrado foi a 30°C.

A cepa de *S. acuminatus* testada por Pepino (2011) apresentou razão de 0,20 (1740/1540) para lipídeos, resultado inferior aos encontrados para todas as condições testadas com a cepa D115WC, já a cepa *Scenedesmus* sp. clone MJ13 avaliada apresentou valor superior (1,28) aos obtidos neste estudo.

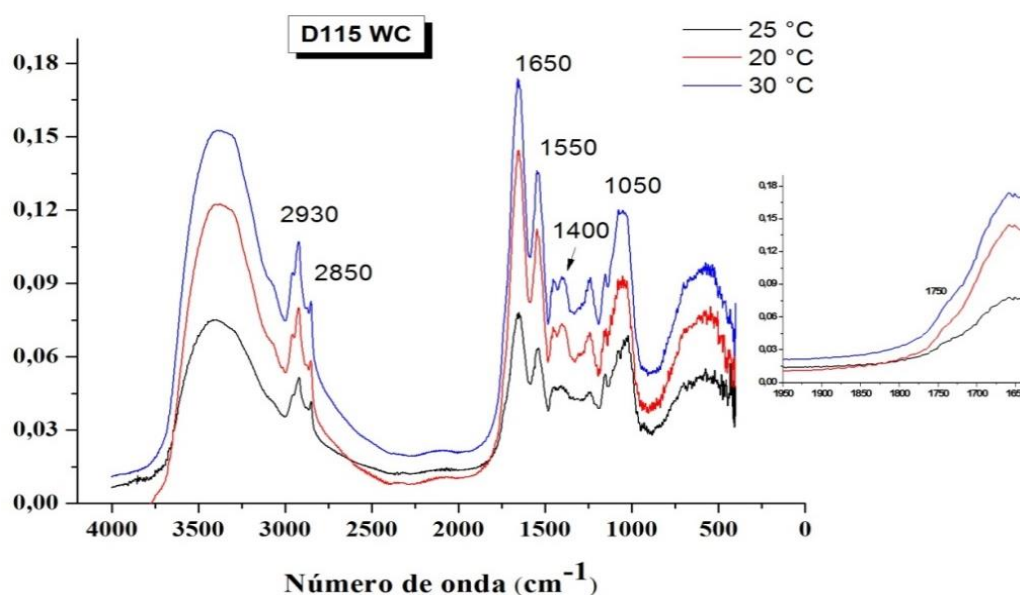


Figura 16. Espectros de absorvância de IV da cepa D115WC cultivada em diferentes temperaturas.

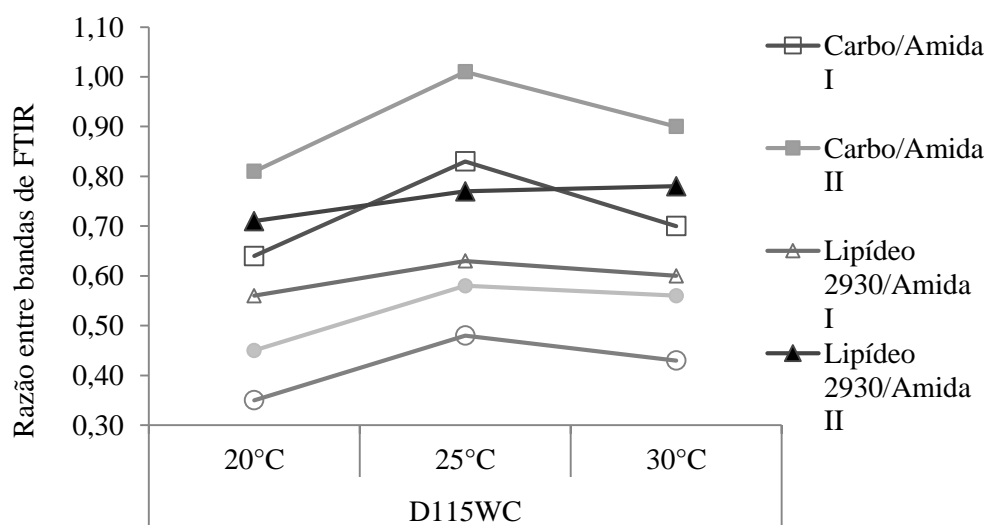


Figura 17. Razões obtidas entre as bandas de carboidrato e lipídeos e as bandas de amida I e amida II para a cepa D115WC nos cultivos em diferentes temperaturas.

Os espectros de IV obtidos pela metodologia de FTIR da cepa D132WC em diferentes temperaturas estão representados na figura 18. Pode-se perceber a presença de todas as bandas características de microalgas, com picos bem definidos de amida I e II, a banda de polissacarídeos a 1047 cm^{-1} , a banda de C-H de ácidos graxos a 2930 cm^{-1} e a banda característica de lipídeo a 1750 cm^{-1} , que foi mais evidente no espectro a 25°C , em destaque na figura 18.

As razões utilizando a banda de amida II, assim como para as outras cepas, apresentaram valores superiores aos obtidos com a banda de amida I em todas as temperaturas testadas, porém com valores proporcionais (Figura 19). As maiores razões para carboidrato foram obtidas no cultivo a 25°C , com valores de 0,75 (carbo/amida I) e 0,95 (carbo/amida II) e as menores no cultivo a 30°C , com valores de 0,44 (carbo/amida I) e 0,63 (carbo/amida II) resultado semelhante ao obtido pela metodologia tradicional.

As razões obtidas com a banda de 2930 cm^{-1} apresentaram os maiores valores, com 0,75 (2930/amida I) e 0,95 (2930/amida II), nos cultivos a 25°C ; enquanto que a banda de 1750 cm^{-1} evidenciou uma queda gradual à medida que houve elevação da temperatura, assim se assemelha ao resultado obtido por gravimetria (BLIGH & DYER, 1959) apenas no que diz respeito aos maiores teores, que foram a 20°C .

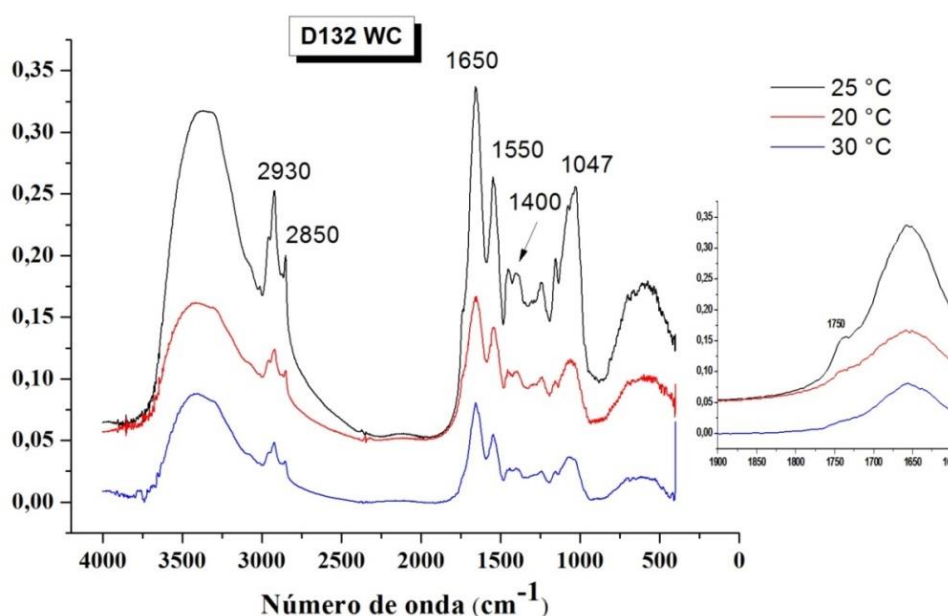


Figura 18. Espectros de absorvância de IV da cepa D132WC cultivada em diferentes temperaturas.

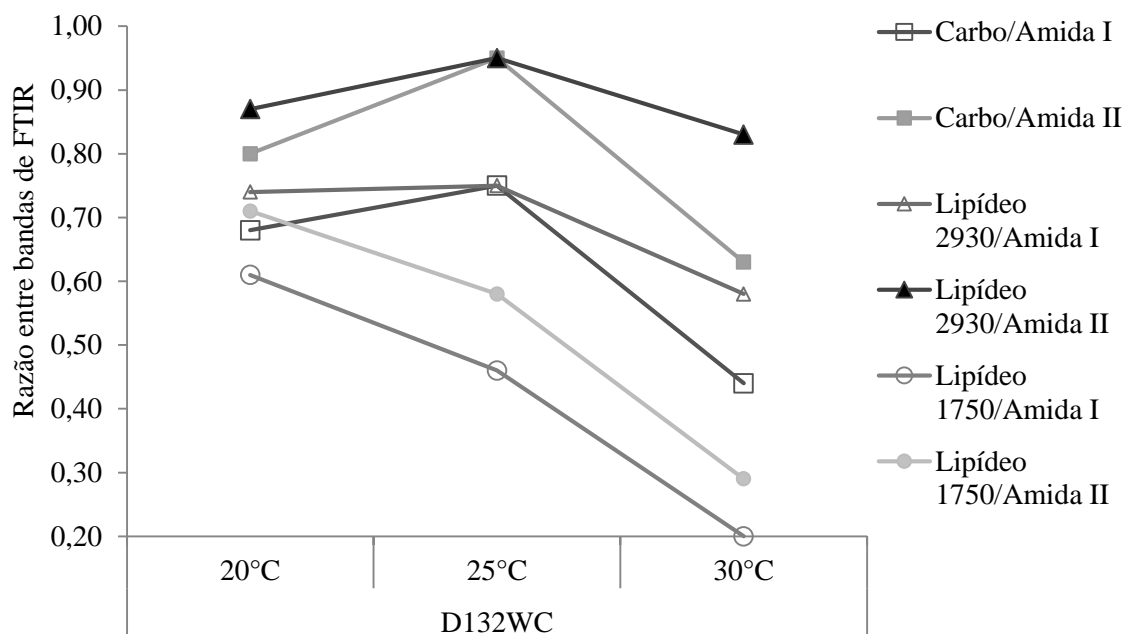


Figura 19. Razões obtidas entre as bandas de carboidrato e lipídeos e as bandas de amida I e amida II para a cepa D132WC nos cultivos em diferentes temperaturas.

A metodologia de FTIR ainda está sendo aperfeiçoada para que possa ser mais bem utilizada como indicativo de concentrações lipídicas e de carboidratos em microalgas, principalmente associadas com outras metodologias (Giordano *et al.*, 2001; Hattab *et al.*, 2006). Alguns autores obtiveram boas correlações entre metodologias tradicionais de lipídeo e carboidrato e razões de FTIR (Meng *et al.*, 2014).

Pepino (2011) relata que a metodologia de Bligh & Dyer (1959) pode não ser adequada para extração lipídica dependendo do tipo de célula da microalga trabalhada, e que por extrair todas as substâncias polares da amostra (uso de clorofórmio:metanol) isto pode aumentar o erro dos resultados. Já Santos *et al.* (2015) em trabalho que testou diversas metodologias de extração lipídica em biomassa de *Chlorella vulgaris*, aponta que o método com clorofórmio: metanol (2:1) e ultrassom apresentou melhores resultados. Contudo faz-se necessário a avaliação destas técnicas também em microalgas de outros grupos taxonômicos, como cianobactérias e diatomáceas, já que esta possui uma parede celular com depósitos de sílica ($\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$), conhecida como frústula e aquela possui parede celular desprovida de celulose e constituída de polissacarídeos ligados a polipeptídeos; o que pode dificultar a etapa de rompimento celular (Calijuri *et al.*, 2006).

6. CONCLUSÕES

a) Foram isoladas 10 cepas de microalgas de corpos d'água doce que foram inseridas no Banco de Microalgas do LARBIM. Destas, 7 foram identificadas como pertencente ao filo Chlorophyta (D26Z, D33Z, D90Z, D97Z, D115WC, D132WC e D133WC) e 3 ao filo Cyanophyta (D39Z, D46Z e D103Z).

b) Cinco cepas foram identificadas até nível de espécie (D33Z – *Chlorella cf minutissima*, D46Z – *Synechococcus nidulans*, D103Z – *Synechococcus nidulans*, D115WC – *Scenedesmus acuminatus* e D133WC – *Lagerheimia longiseta*) e quatro até nível de gênero (D26Z – *Desmodesmus* sp., D39Z – *Planktothrix* sp., D90Z – *Chlorococcum* sp. 1, e D97Z – *Chlorococcum* sp.2,). A taxonomia apenas não foi possível ser realizada a nível específico para a cepa D132WC.

c) 60% das microalgas cultivadas apresentaram valores de ésteres inferiores à soja, entretanto as cepas D115WC e D132WC apresentaram mais que 200% do teor encontrado para a soja, com valores de 415,7 mg.g⁻¹ e 397,1 mg.g⁻¹, respectivamente, sendo consideradas promissoras para a produção de biocombustíveis. Todas as 10 microalgas estudadas apresentaram teores de ácido palmítico, esteárico, palmitoléico e linolênico.

d) A cepa D39Z se destacou por apresentar maior percentual do ácido graxo essencial γ -linolênico, com 18,1%. Enquanto que, seguindo os critérios estabelecidos pela norma internacional EN14214, as cepas D115WC e D132WC foram consideradas promissoras para a produção de biodiesel.

e) A temperatura influenciou de forma distinta cada cepa (D39Z, D115WC e D132WC), alterando todas as variáveis avaliadas. Em todas as cepas testadas os cultivos a 20°C reduziram o rendimento final em biomassa, enquanto que a 30°C houve incremento de biomassa.

f) A cepa D115WC apresentou maior teor de ésteres no cultivo a 30°C. Contudo, a 20°C a cepa aumentou seu conteúdo proteico e de carboidratos, e a 25°C seu teor lipídico. Já a cepa D39Z apresentou maior teor de carboidratos quando cultivada a 30°C, porém apresentou maior teor de ésteres e conteúdo proteico a 25°C. Já a 20°C além da queda no rendimento em biomassa houve aumento do tempo de cultivo, assim esta temperatura foi considerada imprópria para o cultivo da cepa D39Z. A cepa D132WC cultivada a 20°C apresentou maiores valores de velocidade de crescimento, conteúdo proteico, de carboidratos, lipídico e de ésteres, sendo considerada sua temperatura ideal de cultivo.

g) Pode-se concluir que dependendo do produto final almejado uma cepa pode ser direcionada para distintas rotas metabólicas e composições químicas de biomassa diferenciadas serão obtidas, levando em conta as variáveis impostas nos cultivos.

h) São necessários estudos mais aprofundados que abordem a eficiência da metodologia gravimétrica para teores lipídicos em diferentes grupos taxonômicos de microalgas.

i) A metodologia de FTIR mostrou-se promissora para a utilização com microalgas, já que pode ser realizada sem tratamento prévio da amostra e é mais rápida que as metodologias tradicionais empregadas. Houve maior correspondência entre as razões obtidas por FTIR e o conteúdo lipídico obtido por método gravimétrico, do que com o teor de carboidratos obtido por metodologia tradicional.

7. REFERÊNCIAS

Abou-Shanab, R.A.I., Jae-Hoon H., Cho, Y., Min, B.E. & Byong-Hun, J. (2011) Characterization of microalgal species isolated from fresh water bodies as a potential source for biodiesel production. **Applied Energy**, 2011.

Acme-Hardesty. (2014a) **Palmitic Acid (C16)**. Disponível em: <<http://www.acme-hardesty.com/product/palmitic-acid-c16/>>. Acesso em: 30 jun. 2014.

Acme-Hardesty. (2014b) **Stearic Acid (C18)**. Disponível em: <<http://www.acmehardesty.com/product/stearic-acid-c18/>>. Acesso em: 30 jun. 2014.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Watson, J. D. (1997) **Biologia molecular da célula**. 3 ed. Porto alegre: Artes Médicas.

Álvarez, J.G. Utilidad del ácido docosaheptaenoico en el tratamiento de la infertilidad masculina. (2011) **Revista Internacional de Andrología**, 9(4): 138-144.

Barros, K.K.S. **Produção de biomassa de *Arthrospira platensis* (*Spirulina platensis*) para alimentação humana**. João Pessoa: UFPB, 2010. 112 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2010.

Bastos, V.D. (2012) **Biorrefinarias, biocombustíveis e química renovável: revolução tecnológica e financiamento**. Revista do BNDES, 38: 85-138.

Becker, E.W. (2007) Micro-algae as a source of protein. **Biotechnology Advances**, 25: 207–210.

Bellinger, E.G. & Sigee, D.C. (2010) **Freshwater Algae: Identification and Use as Bioindicators**. Wiley-Blackwell.

Bell, P.R. & Hemsley, A.R. (2000) **Green Plants: Their origin and diversity**. 2. ed. Cambridge.

Benemann, J. (2013) Microalgae for Biofuels and Animal Feeds. **Energies**, 6: 5869-5886.

Bertoldi, F.C.; Sant'anna, E. & Oliveira, J.L.B. (2008) - Revisão: Biotecnologia de microalgas. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, 26:9-20.

Bicudo, C.E.M. & Bicudo, R.M.T. (1970) **Algas de águas continentais brasileiras: chave ilustrada para identificação de gêneros**. São Paulo: Fundação para o Desenvolvimento do Ensino de Ciências.

Bicudo, C.E.M. & Menezes M. (2006) **Gêneros de Algas de Águas Continentais do Brasil: Chave de identificação e descrições**. 2 ed. São Carlos: Rima.

Blaby I. K., Blaby-Haas C. E., Tourasse N., Hom E. F., Lopez D., Aksoy M., et al. (2014). The *Chlamydomonas* genome project: a decade on. **Trends in Plant Science**, 19, 672–680.

Bligh, E.G. & Dyer, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. (1959) **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, 37(8): 911-917.

Borges, F.C. **Proposta de um modelo conceitual de biorrefinaria com estrutura descentralizada**. 2010. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

Brown, M.R., Jeffrey, S.W., Volkman, J.K. & Dunstan, G.A. (1997) Nutritional properties of microalgae for mariculture. **Aquaculture**, 151(1-4): 315–331.

Calijuri, M.C., Alves, M.S.A. & Santos, A.C.A. (2006) **Cianobactérias e Cianotoxinas em Águas Continentais**. São Carlos: Rima.

Cardoso, A. S., Vieira, G.E.G. & Marques, A.K. (2011) O uso de microalgas para a obtenção de biocombustíveis. Porto Alegre: **Revista Brasileira de Biociências**, 4: 542-549.

Carvajal, J.C.L. (2009) **Caracterização e modificações químicas da proteína da microalga *Spirulina* (*Spirulina maxima*)**. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 138 p.

Carvalho L.R.; Pipole F.; Werner V.R.; Laughinghouse I.V.H.D.; Camargo A.C.M.; Rangel M., Konno K. & Sant’Anna C.L. (2008) A toxic cyanobacterial bloom in an urban coastal lake, Rio Grande do State, southern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, 39:761-769.

Chankova S.G., Dimova E.G., Mitrovska Z., Miteva D., Mokerova D.V., Yonova P.A. & Yurina N.P. (2014) Antioxidant and HSP70B responses in *Chlamydomonas reinhardtii* genotypes with different resistance to oxidative stress. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 101: 131-137.

Chaudhary, L.; Pradhan, P.; Soni, N.; Singh, P.; Tiwari, A. (2014) Algae as a Feedstock for Bioethanol Production: new entrance in biofuel world. **International Journal of ChemTech Research**, 6(2): 1381-1389.

Chodat, R. (1902) **Algues Vertes de la Suisse**: Pleurococcoïdes – Chroolepoïdes.

Cook, J.R. (1963). Adaptations in growth and division in *Euglena* effected by energy supply. **The Journal of Protozoology**, 10: 436-444.

Coqueiro D.P., Bueno P.C.S. & Simões M.J. (2011). Uso da suplementação com ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 associado ao exercício físico: uma revisão. **Pensar a Prática**, 14: 1-15.

Costa, J.A.V.; Radmann, E.M.; Cerqueira, V.S.E.; Santos, G. C. E Calheiros, M. N. (2006) Perfil de ácidos graxos das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Chlorella minutissima* cultivadas em diferentes condições. **Alimentos e Nutrição**, 17(4),429-436.

Costenoble, O.; Mittelbach, M.; Schober, S.; Fischer, J. & Haupt, J. (2008) **Improvements needed for the biodiesel standard EN 14214**.

Croft, M. T.; Lawrence, A. D., Raux-Deery, E., Warren, M. J.; Smith, A. J. (2005) Algae acquire vitamin B₁₂ through a symbiotic relationship with bacteria. **Nature**, 438: 90-93.

Cunha, T.H.C.S. **Avaliação do crescimento de microalgas para produção de biocombustível utilizando efluente industriais e doméstico**. (2014) 61 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Sanitária e Ambiental), Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2014.

Davis R. & Mauer L. (2010) Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy: a rapid tool for detection and analysis of foodborne pathogenic bacteria. **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**, 2: 1582–1594.

Dean, A.P.; Sigee, D.C.; Estrada, B. & Pittman, J.K. (2010) Using FTIR Spectroscopy for rapid determination of lipid accumulation in response to nitrogen limitation in freshwater microalgae. **Bioresource Technology**, 101: 4499–4507.

Derner, R.B.; Ohse, S.; Villela, M.; Carvalho, S.M. & Fett, R. (2006) Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, Santa Maria, 36(6): 1959-1967.

Derner, R.B. **Efeito de fontes de carbono no crescimento e na composição bioquímica das microalgas *Chaetoceros muelleri* e *Thalassiosira fluviatilis*, com ênfase no teor de ácidos graxos poli-insaturados**. 2006. 140 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

Ercisli, S.; Orhan, E.; Yildirim, N. & Ar, G.A. (2008) Comparison of Sea Buckthorn Genotypes (*Hippophae rhamnoides* L.) Based on RAPD and FAME Data, **Turkish Journal Of Agriculture And Forestry**, 32: 363–368,.

Fernández, L.C.; Serra, J.D.; Álvarez, J.R.M.; Alberich, R.S. & Jiménez, F.P. (2011) Grasas de la dieta y salud cardiovascular. **Atención Primaria**, 43(3): 157-157.

Fernández-Reiriz, M.J.; Perez-Camacho, A.; Ferreiro, M.J.; Blanco, J.; Planas, M., Campos, M.J. & Labarta, U. (1989) Biomass production and variation in the biochemical profile (total protein, carbohydrates, RNA, lipids and fatty acids) of seven species of marine microalgae. **Aquaculture**, 83: 17–37.

Ferreira, V.F.; Silva, F.C. & Ferreira, P.G. (2013) Carboidratos como fonte de compostos para a indústria de química fina. **Química Nova**, 36(10): 1514-1519.

Franceschini, M.I.; Burliga, L.A.; Reviers, B.; Prado, F.J. & Rézig, H.S. (2010) **Algas: uma abordagem filogenética, taxonômica e ecológica.**: Artmed, 332p.; Il.: color. Porto Alegre.

Franco, A. L. C.; Lôbo, I. P.; Cruz, R. S.; Teixeira, C. M. L. L.; Neto, J. A. A.; Menezes, R. S. (2013) Biodiesel de microalgas: avanços e desafios. **Química. Nova**, 36(3): 437-448.

Gava, A.J. (1998) **Princípios de tecnologia de alimentos**. 1^a ed. Ed. Nobel.

Giordano, M.; Kansiz, M.; Heraud, P.; Beardall, J.; Wood, B. & Mcnaughton, D. (2001) Fourier transform infrared spectroscopy as a novel tool to investigate changes in intracellular macromolecular pools in the marine microalga *Chaetoceros muellerii* (Bacillariophyceae). **Journal Phycology**, 37: 271–279.

Gomes, A.M.A. (2011) **Estudo ecofisiológico de cianobactérias formadoras de florações na lagoa de Jacarepaguá**. 2011. 186 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas (Biofísica)) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2011.

Gómez, F.; Furuya, K. & Takeda, S. (2005) Distribution of the cyanobacterium *Richelia intracellularis* as an epiphyte of the diatom *Chaetoceros compressus* in the western Pacific Ocean. **Journal of Plankton Research**, 27: 323-330.

Gomont, M.M. (1892) Monographie des Oscillariées (Nostocacées Homocystées). **Annales des Sciences Naturelles, Botanique**, 15: 91–264.

Guillard, R.R.L. & Lorenzen, C.J. (1972) Yellow-green algae with chlorophyllide c. **Journal Phycology**, 8: 10-14.

Guiry, M.D. & Guiry, G.M. [on line]. Algaebase. Word-wide eletronic publication, National University of Ireland, Galway. Disponível na Internet via://www.algaebase.org. (Acesso em 2014).

Hanagata, N.; Takeuchi, T.; Fukukj, Y.; Barnes, D. J. & Karube, I. (1992) Tolerance of microalgae to high co, and high temperature. **Phytockmistry**, 31(10): 3345-3348.

Hattab, N. E.; Daghbouche, Y.; Hattab, M. E.; Piovetti, L.; Garrigues, S. & Guardia, M. (2006) FTIR-determination of sterols from the red alga *Asparagopsis armata*: Comparative studies with HPLC. **Talanta**, 68: 1230–1235.

Heinbokel, J.F. (1986) Occurrence of *Richelia intracellularis* (Cyanophyta) within the diatoms *Hemiaulus haukii* and *H. membranaceus* off Hawaii. **Journal of Phycology**, 22: 399-403.

Jayappriyan KR, Rajkumar R, Venkatakrishnan V, Nagaraj S, Rengasamy R (2013) In vitro anticancer activity of natural β -carotene from *Dunaliella salina* EU5891199 in PC-3 cells. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, 3: 99–105.

Karatay, S.E. & Dönmez, G. (2011) Microbial oil production from thermophile cyanobacteria for biodiesel production. **Applied Energy** 88(11): 3632-3635.

Karam LM & Soccol CR. (2007) Efeito da temperatura e pH no cultivo de *Spirulina major*. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, 10(1): 5-7.

Kimor, B.; Reid, F.M.H. & Jordan, J.B. (1978) An unusual occurrence of *Hemiaulus membranaceus* Cleve (Bacillariophyceae) with *Richelia intracellularis* Schmidt (Cyanophyceae) off the coast of Southern California in October 1976. **Phycologia**, 17: 162-166.

Komárek, J. & Komárková, J. (2004) Taxonomic review of the cyanoprokaryotic genera *Planktothrix* and *Planktothricoides*. **Czech Phycology**, 4: 1-18.

Latala, A. (1991) Effects of salinity, temperature and light on the growth and morphology of green planktonic algae. **Oceanologia**, 31: 119-138.

Lee, E.R. (1999) **Phycology**. Cambridge University Press.

Lemale, J. (2014) Alimentación para lactantes: leches maternizadas y leches de continuación. **EMC – Pediatría**, 49(1): 1-7.

Li, Y., Y. Chen, P. Chen, M. Min, W. Zhou, B. Martinez, J. Zhu & R. Ruan. (2011) Characterization of a microalgae *Chlorella* sp. well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production. **Bioresource Technology**, 102: 5138–5144.

Lourenço, S.O. (2006) **Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações**. São Carlos: Rima.

Madhu, N. V.; Meenu, P.; Ullas, N.; Ashwini, R. & Rehitha, T.V. (2013) Occurrence of cyanobacteria (*Richelia intercellularis*) - diatom (*Rhizosolenia hebetata*) consortium in the Palk Bay, southeast coast of India. **Indian Journal of Geo-Marine Sciences**, 42(4): 453-457.

Menezes, R.S.; Leles, M.I.G.; Soares, A.T.; Brandão, P.I.; Franco, M.; Antoniosi Filho, N.R.; Sant'Anna, C.L. & Vieira, A.A.H. (2013) Avaliação da potencialidade de microalgas dulcícolas como fonte de matéria-prima graxa para a produção de biodiesel. **Química Nova**, 36(1): 10-15.

Meng, Y.; Yao, C.; Xue, S. & Yang, H. (2014) Application of Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy in determination of microalgal compositions. **Bioresource Technology**, 151: 347–354.

Miranda, J.R.P.C. **Produção de Bioetanol a Partir da Microalga *Scenedesmus obliquus***. 2011. 130 f. Dissertação (Mestrado em Energia e Bioenergia) - Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Monte da Caparica, 2011.

Möllers, K.B.; Cannella, D.; Jørgensen, H. & Frigaard, N. (2014) Cyanobacterial biomass as carbohydrate and nutrient feedstock for bioethanol production by yeast fermentation. **Biotechnology for Biofuels**, 7(64): 2-11.

Oliveira, M. (2011) Vinhaça alternativa: resíduo da produção de etanol pode ser usado para produzir biodiesel. **Pesquisa Fapesp**, 186: 70-74.

Oliveira, O.S.B.C. (2009) **Optimização da produtividade lipídica da microalga *Arthrospira platensis* como matéria-prima para biocombustíveis**. Dissertação (Mestrado em Bioenergia) - Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2009.

Osiro, D.; Coleta Filho, H. D.; Machado, M. A. & Colnago, L. A. (2000) Uso de FTIR para análise de bactérias causadoras do cancro cítrico e CVC. **Comunicado técnico - Embrapa**, 40: 1-5.

Ostenfeld, C.H. & Schmidt, J. (1901) Plankton fra det Røde Hav og Adenbugten. Vidensk. Meddr. dansk naturh. Foren., 141-182.

Palacios S.; Cancelo M. J.; Castaño, M. R.; García, A.; De La Gándara, J. J.; Pintó, X.; Borrego, R. S.; Bannenberg, G. & Gil, E. (2014) Recomendaciones de ingesta de omega-3 en los diferentes periodos de la vida de la mujer. **Progresos de Obstetricia y Ginecologia**, 57(1): 45-51.

Passos, F.; Solé, M.; García, J. & Ferrer, I. (2013) Biogas production from microalgae grown in wastewater: Effect of microwave pretreatment. **Applied Energy**, 108: 168–175.

Pepino, R. F. **Desenvolvimento de procedimentos metodológicos na prospecção de microalgas propícias para a produção de biodiesel**. 2011. 105 f. Dissertação (Ecologia e Recursos Naturais) – Universidade Federal de São Carlos, 2011.

Raven, P.H.; Evert, R.F. & Eichhorn, S.E. (2007) **Biologia Vegetal**. 7. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Renaud, S.M., Zhou, H.C., Parry, D.L., Thinh, L.V., & Woo, K.C. (1995). Effect of temperature on the growth, total lipid content and fatty acid composition of recently isolated tropical microalgae *Isochrysis* sp., *Nitzschia closterium*, *Nitzschia paleacea*, and commercial species *Isochrysis* sp. (clone T.ISO). **Journal of Applied Phycology**, 7: 595-602.

Richmond A. (2004) **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Blackwell Science Ltd.

Santos, R.R.; Moreira, D.M.; Kunigami, C.N.; Aranda, D.A.G. & Teixeira, C.M.L.L. (2015) Comparison between several methods of total lipid extraction from *Chlorella vulgaris* biomass. **Ultrasonics Sonochemistry**, 22: 95–99.

Satô, S.; Paranaguá, M.N. & Eskinazi, E. (1963) On the mechanism of red tide of *Trichodesmium* in Recife Northeastern Brazil, with some considerations of the relation to the human disease, "Tamandaré fever". **Trabalho do Instituto Oceanográfico Universidade do Recife 5/6**: 7-49.

Sayegh, F.A.Q. & Montagnes, D.J.S. (2011) Temperature shifts induce intraspecific variation in microalgal production and biochemical composition. **Bioresource Technology**, 102: 3007–3013.

Séston. (2014) **Tecnologia**. Séston.
<<http://www.seston.com.br/pt/empresa/tecnologia.shtml>> Acesso em: 04 nov. 2014.

Schmitz, R.; Dal Magro, Clinei & Colla, L.M. (2012) Aplicações ambientais de microalgas. **Revista CIATEC-UPF**, 4: 48-60.

Silva, C.R. (2008) **Geodiversidade do Brasil: conhecer o passado, para entender o presente e prever o futuro**. CPRM, Rio de Janeiro.

Sivonen, K. (1990) Effects of Light, Temperature, Nitrate, Orthophosphate, and Bacteria on Growth of and Hepatotoxin Production by *Oscillatoria agardhii* Strains. **Applied and Environmental Microbiology**, 6(9): 2658-2666.

Smith, G.M. (1987) **Botânica Criptogâmica: algas e fungos**. 4. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.

Solazyme. (2014) **Renewable Fuels for the Future**. Solazyme. Disponível em <<http://solazyme.com/>>. Acesso em: 04 nov. 2014.

Solomons, T.W.G. & Fryhle, C.B. (2012) **Química Orgânica**. 10. ed., Rio de Janeiro: LTC.

Spolaore, P.; Joannis-Cassan, C.; Duran, E.E. & Isambert, A. (2006) Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 101: 87-96.

Stehfest K., Toepel J. & Wilhelm C. (2005) The application of micro-FTIR spectroscopy to analyze nutrient stress-related changes in biomass composition of phytoplankton algae. **Plant Physiology and Biochemistry**, 43: 717–726.

Sundström, B.G. (1984) Observations on *Rhizosolenia clevei* Ostenfeld (Bacillariophyceae) and *Richelia intracellularis* Schmidt (Cyanophyceae). **Botanica Marina**, 27: 345-355.

Thompson, P.A.; Guo, Ming-Xin & Harrison, P.J. (1992) Effects of variation in temperature: On the biochemical composition of eight species of marine phytoplankton. **Journal of Phycology**, 28: 481-488.

Tripathi, R.; Singh, J. & Thakur, I. S. (2015) Characterization of microalga *Scenedesmus* sp. ISTGA1 for potential CO₂ sequestration and biodiesel production. **Renewable Energy**, 74: 774-781.

Ueno, Y., Kurano, N. & Miyachi, S. (1998). Ethanol Production by Dark Fermentation in the Marine Green Alga, *Chlorococcum littorale*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. 86. 38-43.

Valduga, E.; Tatsch, P. O.; Tiggemann, L.; Treichel, H.; Toniazzo, G.; Zeni, J. & Di Luccio, M. (2009) Produção de carotenoides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Química Nova**, 32(9): 2429-2436

Vidotti, E. C. & Rollemberg, M. C. (2004) Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. **Química Nova**, 27(1): 139-145.

Viêgas, C. V. **Extração e caracterização dos lipídeos da microalga *Chlorella pyrenoidosa* visando à produção de ésteres graxos**. 2010. 90 f. Dissertação (Mestrado em Química Tecnológica e Ambiental) – Universidade Federal do Rio Grande, 2010.

Yu, P.; Mckinnon, J.J.; Soita, H.W.; Christensen, C.R.; Christensen, D.A. (2005) Use of synchrotron-based FTIR microspectroscopy to determine protein secondary

structures of raw and heattreated brown and golden flaxseeds: A novel approach. **Canadian Journal of Animal Science**, 85: 437-448.

Viso, A.C. & Marty, J.C. (1993) Fatty acids from 28 marine microalgae. *Phytochemistry* 34 (6): 1521-1533.

Vitta, L. (2014) Adicionadas na ração, algas prometem carne mais rica e saudável. *Gazeta do povo*. 2014. Disponível em: <<http://agro.gazetadopovo.com.br/noticias/tecnologia/adicionadas-na-racao-algas-prometem-carne-mais-rica-e-saudavel/>> Acesso em: 21 agt. 2014.

Yucra, H.A. & Tapia, P.M. (2008) El uso de microalgas como bioindicadoras de polución orgánica en brisas de Oquendo, Callao, Perú. **Biologist** (Lima). 6(1): 41-47.

Xin, L; Hong-Ying, H.; Yu-Ping Z. (2011) Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. under different cultivation temperature. **Bioresource Technology**, 102: 3098–3102.

Zambiazi, R.U.I.C.; Przybylski, R.; Zambiazi, M.W. & Mendonça, C.B. (2007) Fatty Acid Composition Of Vegetable Oils And Fats. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, ISSN 19839774. Available at: <<https://revistas.ufpr.br/alimentos/article/view/8399>>. Acesso em: 30 jun. 2014.

Zarrouk C. (1966) **Contribution à l'étude d'une cyanophycée: influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima* (Setch et Gardner) Geitler**. Thèse de doctorat, Faculté des Sciences de l'Université de Paris. France.